

**Funktionelle Analysen von Transkriptionsfaktoren
mit einer Rolle in der chondrogenen und osteogenen
Differenzierung mittels ChIP-seq**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hendrikje Jeannette Hein
aus Mönchengladbach

Berlin 2013

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2008 bis Mai 2013 am Berlin-Brandenburg Center for Regenerative Therapies (BCRT) und am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik unter der Leitung von Dr. Jochen Hecht und Prof. Dr. Stefan Mundlos angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. Stefan Mundlos

Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
Augustenburger Platz 1
Campus Virchow-Klinikum
Charité, Universitätsmedizin Berlin
13353 Berlin
E-Mail: stefan.mundlos@charite.de

Max Planck Institut für Molekulare Genetik
Arbeitsgruppe Development & Disease
Innestr. 63-73
14195 Berlin
E-Mail: mundlos@molgen.mpg.de

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Freie Universität Berlin
Institut für Biologie – Mikrobiologie
Königin-Luise-Straße 12-16
14195 Berlin
E-Mail: rmutzel@zedat.fu-berlin.de

Disputation am: 23.09.2013

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen, als die angegebenen Hilfsmittel und Literaturquellen verwendet habe. Ich versichere, dass diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht.

Berlin, den 30. Mai 2013

Hendrikje Hein

Danksagung

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Mundlos und Dr. Jochen Hecht für die persönliche Unterstützung und das Vertrauen in den letzten Jahren, sowie die Überlassung dieser Arbeit. Auch ein herzliches Dankeschön an Herrn Prof. Rupert Mutzel, der mich so nett empfangen hat und bereit war, meine Arbeit als zweiter Gutachter zu begleiten.

Ich möchte mich besonders bei Jochen bedanken, der mir stets den Rücken freigehalten hat und mir mit seinem Vertrauen viel Raum zum Arbeiten gegeben hat. Ich habe viel von Ihm lernen können! (Und ich hoffe es war nicht nur einseitig, Jochen!).

Liebe Asita! Was wäre unsere kleine Gruppe bloß ohne die beste wissenschaftlich-technische Unterstützung, die man sich nur wünschen kann! Und Danke für Deine immer lieben und unterstützenden Worte und für jegliche Belange geöffnete Ohren!

Mindestens genauso geschätzt bist Du, liebe Saniye! Ohne Dich wäre die Zeit nur halb so schön gewesen (stark untertrieben)! So viele kreative, lustige oder sinnlose Gepspräche, die den Geist gelockert habe! Nun verdanke ich dieser Zeit auch eine tiefe Freundschaft!

Nun aber auch viele herzliche Dankesreden auf weitere Menschen und Kollegen, von denen einige zu lieben Freunden wurden und die für mich diese Zeit zu einer gemacht haben, an die ich mich gerne zurückerinnere! Ein überaus herzliches Dankeschön an Till Scheuer, der mich unnachgiebig unterstützte und mir dabei immer Mut und gute Laune gemacht hat. Du warst eine riesen Hilfe!! Danke, Frau Dr. Wibke Schwarzer, für das Kopfwaschen und Deinen messerscharfen Verstand, der sowohl wissenschaftlich als auch privat große Freude macht! Danke Pia Kuss, die ich viel zu spät kennengelernt habe, aber nicht zu spät! Dank Ihr habe ich gelernt auf überflüssiges Gedankengut zu verzichten. Großen Dank auch meinen Kollegen Daniel Ibrahim, der mich so manches mal wieder auf die Beine gezogen hat und mir durch sein wissenschaftliches Engagement eine große Hilfe war! Dankeschön auch an Malte Spielmann, Martin Franke, Julia Grohmann, Pedro Vallecillo-Garcia, Ivana Jerkovic und Katerina Kraft! 6 weitere Gründe, warum die Arbeit Freude bereitet hat! Danke (!) an die gesamte Arbeitsgruppe, für immer bereitwillige Hilfe und die schöne Zeit! Danke an meine Freunde (entwachsene aus der Lotzestrasse), ihr kennt mich schon so lange und unbedingt immer weiter!

Zuletzt will ich denen danken, die mir am nächsten und liebsten sind: Meine Familie! Vorweg meine wundervollen Eltern: Danke, dass ihr mir das Leben immer leicht gemacht habt und es mir immer leicht machen werdet auch dank meiner geliebten Geschwister Friederike (Danke fürs Korrekturlesen!), Henning, Marten und Wibke, und habt die wundervollste Gabe in mein Leben gebracht: das Klavierspielen! (Danke, Chopin!). Danke, Philip! Du warst die ganze Zeit an meiner Seite.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Skelett	1
1.2	Embryonale Entwicklung des Skeletts	2
1.2.1	Desmale Ossifikation	2
1.2.2	Endochondrale Ossifikation	2
1.3	Molekularbiologische Determinanten der Osteoblasten-differenzierung	4
1.3.1	Runx2 und seine Funktion in der Knochenentwicklung	4
1.3.2	Msx2 und seine Funktion in der Knochenentwicklung	6
1.3.3	Twist-Proteine und ihre Funktion in der Knochenentwicklung	9
1.3.4	Interaktionen zwischen Runx2, Msx2 und Twist-Proteinen	9
1.3.5	Signaltransduktionskaskaden in der molekularen Entwicklung des Skeletts	10
1.4	Genomweite Analysen von Transkriptionsfaktoren	12
1.4.1	Chromatin-Immunpräzipitation	12
1.4.2	Vergleich von Transkriptionsfaktoren mittels ChIP-seq	14
1.5	Hühner-Micromasskulturen als Modell der Chondro- und Osteogenese	14
1.5.1	Untersuchungen von Transkriptionsfaktoren in Hühner-Micromasskulturen	15
1.6	Zielsetzung	16
2	Material	17
2.1	Chemikalien	17
2.2	Lösungen und Puffer	17
2.3	Enzyme	17
2.4	Bakterien	17
2.5	Zelllinien	17
2.7	Kits	18
2.8	Sonstige Geräte	18
2.9	Primer	20
2.10	Vektoren	21
2.10.1	pSlax-5'3xFlag-Vektoren	21
2.10.2	RCASBP-Vektoren	22
2.10.3	Eukaryotische Expressionsplasmide	22
2.10.4	Reporterplasmide	23
2.11	Antikörper	23
2.12	Software	23
2.12.1	Software zur Analyse der ChIP-seq Daten	23
2.12.2	Sonstige verwendete Software	24

2.13	Tiere	24
2.13.1	Hühner	24
2.13.2	Verwendete Mausstämme	24
3	Methoden	25
3.1	Allgemeine Molekularbiologische Methoden	25
3.1.1	DNA-Isolierung	25
3.1.2	RNA-Isolierung	26
3.1.3	Herstellung von cDNA	26
3.1.4	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	27
3.1.5	DNA-Sequenzierung.....	28
3.1.6	Klonierung der NOTCH2-intrazellulären Domäne (ICD)	28
3.1.7	SDS-Polyacrylamidelektrophorese und Western-Blot.....	28
3.2	Histologie	29
3.2.1	Entwässerung und Paraffinisierung von Geweben und Hühnchen-Micromasskulturen.	29
3.2.2	Anfertigung von Gewebeschnitten	30
3.2.3	Gewebefärbungen	30
3.2.4	Immunhistologie	31
3.2.5	<i>In situ</i> Hybridisierung	32
3.2.6	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	34
3.2.7	Hühnchen Micromasskulturen (chMM)	35
3.2.8	Transfektionen	36
3.2.9	Immunzytologie.....	37
3.2.10	Luciferase-Reporter-Assays.....	37
3.3	Chromatin Immunpräzipitation	38
3.4	Next Generation Sequencing (NGS)	41
3.5	Bioinformatische Aufbereitung der Sequenzdaten	42
3.5.1	Primäre Analyse der ChIP-seq Sequenzdaten.....	42
3.5.2	Weiterführende Analysen der ChIP-seq – Daten.....	43
3.6	Analyse der Runx2-knockout Microarrays.....	47
4	Ergebnisse	48
4.1	Test der Expressionskonstrukte auf ihre biologische Aktivität	48
4.1.1	Überexpression von 3xFlag-RUNX2 und 3xFlag-MSX2 in Hühner-Micromasskulturen	48
4.2	Genomweite Identifizierung von RUNX2- und MSX2- Bindestellen in Hühner-Micromasskulturen mittels ChIP-seq	53
4.2.1	Motivanalysen der potentiellen Bindestellen	53
4.2.2	Validierung potentieller Zielgenen von RUNX2	54
4.2.3	Identifizierung potentieller Zielgene von MSX2	59

Validierung potentieller Zielgene von RUNX2 und MSX2	62
4.2.4 Das potentielle Zielgen <i>NOTCH2</i>	62
4.2.5 Die Inhibition der NOTCH-Signalkaskade in Hühner-Micromasskulturen.....	66
4.2.6 Expression von Notch2 in Humeri während der murinen Embryonalentwicklung	67
4.2.7 Funktionelle Analysen des potentiellen RUNX2 und MSX2 Zielgens <i>NOTCH2</i> in Hühner-Micromasskulturen	70
4.3 Vergleichende Analyse von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsfaktor-Mutanten mittels ChIP-seq.....	72
4.3.1 Überexpression der 3xFlag- <i>MSX2</i> -Varianten <i>MSX2^{P7H}</i> , <i>MSX2^{L13P}</i> und <i>MSX2^{R31H}</i> in Hühner-Micromasskulturen	74
4.3.2 Überexpression von 3xFlag- <i>TWIST2</i> und 3xFlag- <i>TWIST2^{S146P}</i> in Hühner-Micromasskulturen	75
4.3.3 Genomweite Verteilung der Bindestellen	75
4.3.4 Vergleiche der genomweiten Bindestellen zwischen Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsfaktor-Mutanten.....	77
4.3.5 Motivanalysen	78
5 Diskussion.....	91
5.1 Expression von 3xFlag-fusionierten Transkriptionsfaktoren in Hühner-Micromasskulturen	91
5.1.1 Die Expression von <i>3xFlag-RUNX2</i> und seine Rolle im Perichondrium	93
5.2 Auswertung der RUNX2-ChIP-seq und potentielle Zielgene von RUNX2	93
5.3 Potentielle Zielgene von MSX2 und RUNX2	95
5.3.1 Der Notch-Signalweg: Ein möglicher regulativer Schnittpunkt von RUNX2 und MSX2 im genregulativen Netzwerk der Osteoblastendifferenzierung	96
5.3.2 Der Einfluss der Notch-Signalkaskade auf die Differenzierung in Hühner-Micromasskulturen	98
5.4 Vergleichende Analysen von Transkriptionsfaktoren	102
5.4.1 Vergleichende Analyse von MSX2 und drei MSX2-Mutationen mittels ChIP-seq.....	102
5.4.2 Die MSX2-Mutationen <i>MSX2^{L13P}</i> und <i>MSX2^{R31H}</i>	104
5.4.3 Die Mutation <i>MSX2^{P7H}</i>	106
5.4.4 Identifikation von Interaktionspartnern durch ChIP-seq.....	108
5.4.5 Analyse von Transkriptionsfaktoren mittels ChIP-seq – ein Resümee	112
6 Zusammenfassung.....	115
7 Summary	116
8 Literaturverzeichnis	117
9 Abkürzungsverzeichnis	127
10 Anhang	128

1 Einleitung

1.1 Das Skelett

Im Gegensatz zur häufigen Annahme ist das Skelett ein sehr lebendiges Organ, das jedem Individuum seine einzigartige Gestalt verleiht. Allein aufgrund des Skeletts kann die Morphologie eines Lebewesens rekonstruiert werden, und es fasziniert uns Menschen schon von klein auf. Dank fossiler Skelette können wir heute einen Blick auf den Verlauf der Evolution der Vertebraten werfen. Diese brachte Neuheiten, wie ein Binnenskelett, und die Schädelkapsel (Neurocranium) zum Schutze des Gehirns und der Sinnesorgane hervor. Das Skelett stützt unseren Körper, ermöglicht zusammen mit den an ihm verknüpften Muskeln und Sehnen unsere Bewegung und schützt die Organe. Es ist aber auch physiologisch hoch aktiv. So unterliegt das Skelett lebenslangen Veränderungsprozessen des Knochenabbaus und -aufbaus (Homöostase), es produziert Blutzellen, speichert Mineralien und ist oft Grund für viele Erkrankungen. So ist das Verständnis der Entwicklung des Skeletts für die Medizin und die Biologie schon lange und immer noch von großem Interesse und dessen Erforschung liefert Erkenntnisse, die sowohl aus evolutionsbiologischer, entwicklungsbiologischer als auch medizinischer Sicht von großer Bedeutung sind.

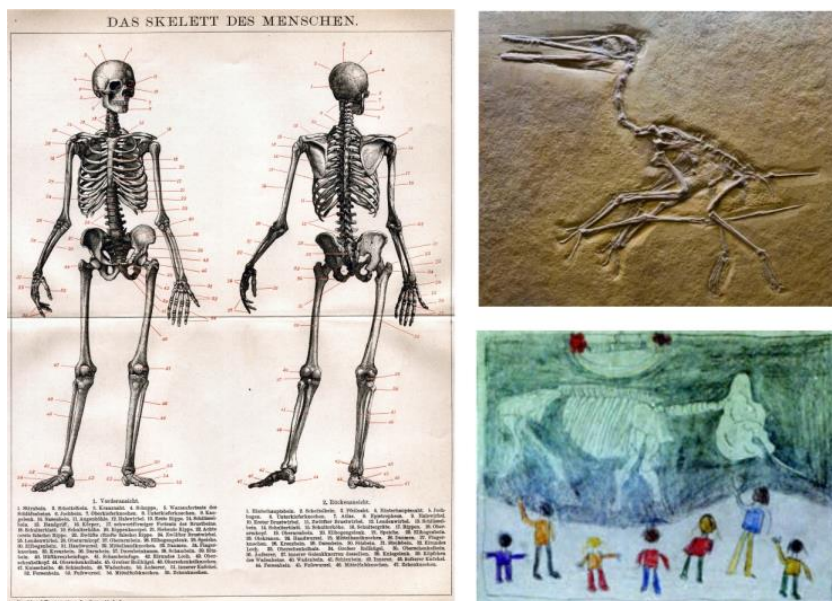


Abbildung 1.1 Das Skelett aus verschiedenen Blickwinkeln. Links: Das Skelett des Menschen aus Brockhaus' Konversationslexikon (14. Auflage). Oben rechts: Fossil eines Kurzschwanzflugsauriers aus dem Naturkundemuseum Berlin. Unten rechts: Kinderzeichnung eines Elefantenskeletts aus dem Naturkundemuseum Kassel.

1.2 Embryonale Entwicklung des Skeletts

Das Skelett der Vertebraten entwickelt sich embryonal aus drei unterschiedlichen mesenchymalen Zellpopulationen: Das axiale Skelett des Rumpfes entsteht aus den Somiten. Das appendikuläre Skelett der Extremitäten entwickelt sich aus Zellen des lateralen Plattenmesoderms und Zellen der Neuralleisten formen die craniofacialen Knochen bzw. Knorpel-elemente. Die Entwicklung aller Skelettelemente während der Embryonalentwicklung beginnt mit proliferierenden mesenchymalen Zellen, die dicht gepackte Kondensationen bilden. Die weitere Differenzierung läuft je nach der Art des sich entwickelnden Knochens, aber unabhängig von der Zellherkunft, über zwei unterschiedliche Mechanismen ab. Während die Vorläuferzellen in der desmalen Knochenbildung oder Ossifikation direkt in frühe Knochenvorläuferzellen (Osteoblasten) und schließlich in reife Knochenzellen (Osteozyten) differenzieren, bedarf die Entwicklung von Knochen durch die endochondrale Ossifikation einer vorausgehenden Differenzierung in Knorpelzellen (Chondrozyten), welche anschließend durch Osteoblasten und Osteozyten ersetzt werden.

1.2.1 Desmale Ossifikation

Die Knochen des Schädels, Teile des Schlüsselbeines (Clavicula), des Beckens und die Handwurzelknochen verknöchern durch die desmale Ossifikation. In den Kondensationen beginnt die desmale Ossifikation mit der Determinierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten. Diese beginnen mit der Sezernierung einer kollagenhaltigen Matrix, die durch die Einlagerung von Calciumphosphat aushärtet. Osteoblasten werden dabei selber in die Knochenmatrix eingebettet und reifen zu sogenannten Osteozyten. Mit der beginnenden Bildung der Matrix bildet sich das Periost, eine Membran aus kompakten Zellen, welche die osteogenen Kondensationen umschließen. Aus dem Periost migrieren Osteoblastenvorläufer in die Kondensationen, um dort ebenfalls zu Osteoblasten und später Osteozyten zu differenzieren.

1.2.2 Endochondrale Ossifikation

Die endochondrale Ossifikation unterscheidet sich durch die vorläufige Bildung eines knorpeligen Skelettelements, welches später abgebaut und durch Knochen ersetzt wird. Am besten untersucht sind die Röhrenknochen der Extremitäten (Abbildung 1.2). Die erste Vorstufe sind sogenannte mesenchymale Kondensationen dieser Vorläuferzellen, die bald den Transkriptionsfaktor *Sox9* exprimieren und sowohl in Osteoblasten, als auch in Chondrozyten differenzieren können (Akiyama et al., 2005). Zellen mit hoher *Sox9*-Expression im Zentrum der Kondensation differenzieren später in Chondrozyten.

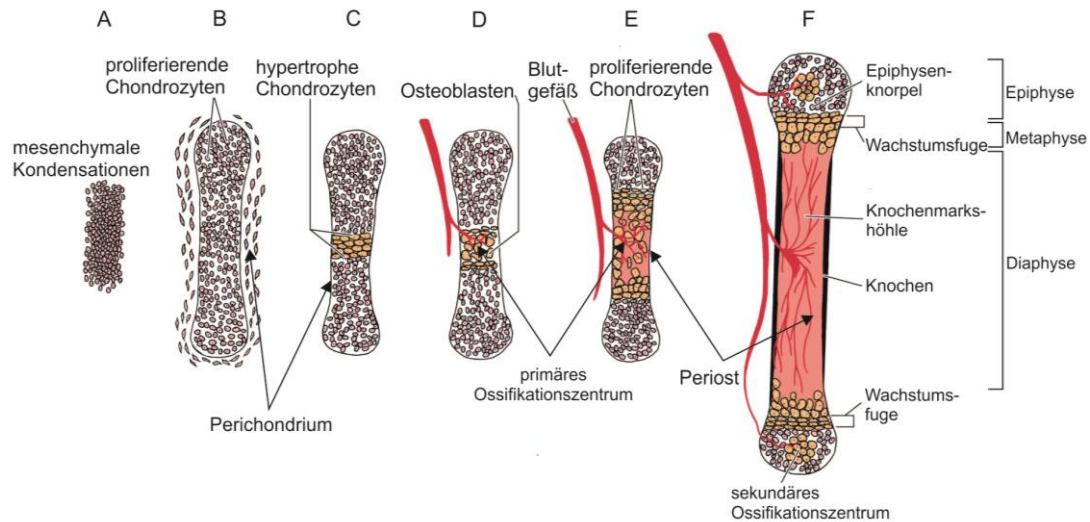


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der endochondralen Ossifikation. A) Mesenchymale Zellen bilden die Kondensationen. B) Die mesenchymalen Zellen differenzieren in Chondrozyten und proliferieren innerhalb des Perichondriums. C) Im Zentrum der Diaphyse reifen die ersten Zellen in hypertropen Chondrozyten. D) Gefäße zusammen mit Osteoblasten wandern in die Zone der hypertropen Chondrozyten und bilden das primäre Ossifikationszentrum. E) Proliferierende Chondrozyten befinden sich noch in den Wachstumsfugen der Metaphysen. F) In den Epiphysen bilden sich die sekundären Ossifikationszentren umgeben von ruhenden Chondrozyten des permanenten Epiphysenknorpels. Das primäre Ossifikationszentrum hat sich ausgedehnt und bildet nun die Knochenmarkshöhle zwischen den beiden Wachstumsfugen der Metaphysen und ist vom verknöcherten Periost (vorher Perichondrium) umsäumt. (Verändert nach Gilbert, Scott F., *Developmental Biology*, 8. Auflage (Gilbert, 2006)).

Sie beginnen zu proliferieren und produzieren dabei eine Knorpelmatrix, die Kollagen des Typs 2 enthält. Mit zunehmender Zellzahl organisieren sie sich innerhalb des sich ausbildenden Perichondriums, das aus den außenliegenden Zellen der Kondensation mit geringerer *Sox9*-Expression gebildet wird (Akiyama et al., 2005). Das Perichondrium ist auch der Vorläufer des Periosts, dessen Zellen als charakteristisches Markergen *Kollagen 1a1* exprimieren. Durch das Perichondrium räumlich begrenzt entsteht ein immer dichter werdendes Gewebe, und die Zellen in der Kondensation entwickeln eine zunehmend organisierte Struktur entlang der Längsachse. Die ersten Chondrozyten im Zentrum der Kondensation stoppen die Zellteilung und verändern ihre Form von spindelförmig in rundliche Zellen, die sogenannten prähypertropen Chondrozyten, und exprimieren *Indian Hedgehog*. Im Verlauf der Differenzierung nehmen die Chondrozyten weiter an Größe zu und bilden im Zentrum des sich entwickelnden Skelettelements hypertrophe Chondrozyten. Diese exprimieren *Kollagen 10a1* als spezifisches Markergen. Schließlich sterben die hypertropen Chondrozyten durch Apoptose ab. Nun dringen Blutgefäße durch das Perichondrium in die Zone der apoptotischen, hypertropen Chondrozyten. Zusammen mit den Blutgefäßen wandern auch Osteoklasten (knochenspezifische Makrophagen) ein, die die apoptotischen Zellen und die Knorpelmatrix abbauen und Platz für aus dem Periost einwandernde Osteoblasten schaffen. Während die Osteoblasten durch die Produktion von Knochenmatrix im primären Ossifikationszentrum des

wachsenden Knochenschafts (Diaphyse) die Knochenbälkchen (trabekulären Knochen) aufbauen, bildet sich in der Peripherie der Diaphyse der Kompaktknochen. Dieser wird durch Osteoblasten des Periosts gebildet. In den Epiphysen bildet sich nun auch das sekundäre Ossifikationszentrum, welches später zur sogenannten Spongiosa wird. Die Metaphysen verknochern nicht und bilden die Wachstumsfugen aus Knorpelzellen, die das Längenwachstum des Knochens ermöglichen.

1.3 Molekularbiologische Determinanten der Osteoblastendifferenzierung

Die molekularbiologische Grundlage für die geordnete Differenzierung des Skeletts ist ein genregulatorisches Netzwerk aus Transkriptionsfaktoren und Signalmolekülen. Die Untersuchung dieses Netzwerkes wurde vor allem durch Forschungen zu Mutationen in seinen Schlüsselkomponenten ermöglicht, die zu Skelettfehlbildungen führen. Die Erforschung dieser Mutationen in Mausmodellen und die Aufklärung der Pathomechanismen schafften ein vertieftes Verständnis der Skelettentwicklung und identifizierte neue relevante Faktoren sowie deren Beziehungen untereinander. Eine wichtige Entdeckung war die Funktion des Transkriptionsfaktors Runx2 in der Skelettentwicklung (Mundlos et al., 1997; Komori et al., 1997; Otto et al., 1997; Ducy et al., 1997). Runx2 wird beschrieben als einer der Schlüsselfaktoren des genregulatorischen Netzwerks der endochondralen und desmalen Osteoblastendifferenzierung. Ausgehend von dessen zentraler Stellung im genregulatorischen Netzwerk galt auch den Interaktionen von Runx2 mit anderen Transkriptionsfaktoren ein gehobenes Interesse, und dies führte zur Entschlüsselung vieler neuer genregulativer Beziehungen.

Ein Beispiel hierfür sind die gewonnenen Erkenntnisse über drei humangenetische Syndrome und deren zugrundeliegenden Mutationen. Die Cleidocraniale Dysplasie (CCD) wird durch Mutationen in *RUNX2* ausgelöst (Mundlos et al., 1997), der Craniosynostose (CRS) und Foramina parietalia (PFM) liegen Mutationen in *TWIST1* und *MSX2* zugrunde (Jabs et al., 1993; Garcia-Miñaur et al., 2003; Wilkie et al., 2000; El Ghouzzi et al., 2001) und alle drei zeigen einen überlappenden Phänotyp in den Schädelknochen.

1.3.1 Runx2 und seine Funktion in der Knochenentwicklung

Die Erkenntnis, dass Mutationen in *RUNX2* mit der autosomal dominant vererbten Knochenfehlbildung Cleidocraniale Dysplasie (CCD) assoziiert sind, ließ vermuten, dass *RUNX2* eine Funktion in der Skelettentwicklung hat (Mundlos et al., 1997). So spiegelt die heterozygote Deletion von *Runx2* in Mäusen den Phänotypen der CCD maßgeblich wieder (Otto

et al., 1997; Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997): Die Mäuse entwickeln Hypoplasien vor allem an desmal ossifizierenden Skelettelementen, wie dem Beckengürtel (Pelvis) und der Schädeldecke, die weit offene Fontanellen sowie verbreiterte Schädelnähte aufweist. Die Clavicula, die sowohl desmal als auch endochondral ossifiziert, ist nur rudimentär vorhanden.

Die Untersuchung des Skeletts homozygoter *Runx2*-defizienter Mäuse zeigte, dass das Skelett durch das Ausbleiben der Osteoblastendifferenzierung aus den mesenchymalen Vorläuferzellen des Perichondriums nicht verknöchert (Otto et al., 1997). So ist im homozygoten Zustand auch die Verknöcherung der endochondral entstehenden Knochen betroffen. Dort ist die Entwicklung durch die eingeschränkte Differenzierung der Chondrozyten in allen Skelettelementen stark verzögert.

Die desmal ossifizierenden Teile des Skeletts, wie die Knochen der Schädeldecke und die Schlüsselbeine, fehlen vollständig. Daher ist das Skelett nur aus Knorpel aufgebaut. Neugeborene homozygote Mäuse sterben kurz nach der Geburt, da der Brustkorb aufgrund der ausbleibenden Verknöcherung die notwendige Kraft für die Atmung nicht aufbringen kann.

Die vorgezogene Expression von *Runx2* in Mäusen führt zur beschleunigten Verknöcherung der Schädelnähte (Craniosynostose) und verkürzten Extremitäten mit zusätzlichen distalen Knochen an den Autopoden (Maeno et al., 2011).

Runx2 und seine Rolle in der Genregulation

Runx2 gehört zu der aus drei Mitgliedern bestehenden Familie der *runt-related* Transkriptionsfaktoren in Vertebraten. Der Name entstammt aus ihrer Homologie zum Paarregelgen *runt* in *Drosophila*. Allen gemeinsam ist die runt-DNA-Bindedomäne. Diese erkennt ein bis zu *Drosophila* konserviertes Motiv mit der Konsens-Basenpaarsequenz YTYGGTY (Y = Pyrimidin = T oder C) (Kamachi et al., 1990) und wurde in vielen Promotoren osteoblastenspezifischer Gene gefunden, die *Runx2* reguliert (Geoffroy et al., 1995; Ducy et al., 1997).

In den letzten Jahren wurden für *Runx2* viele Kofaktoren identifiziert. Hierzu gehören Mitglieder vieler Signaltransduktionskaskaden und hoch konservierte Transkriptionsfaktoren wie die *Msx*- und *Twist*-Proteine (Abbildung 1.3) (Long, 2012; Schroeder et al., 2005). Neben Transkriptionsfaktoren interagieren auch Chromatin-modifizierende Faktoren wie Histon-Deacetylasen (HDACs) mit *Runx2* (Vega et al., 2004). Im C-Terminus von *Runx2* liegt eine Domäne, die vor allem mit Korepressoren interagiert. Zu diesen gehören die Mitglieder der *transducin-like enhancer of split* (TLE)-Familie und die Transkriptionsfaktoren der *Hairy and enhancer of split* (Hes)-Familie. Dies erlaubt auch die Integration von Signalen der Notch-Signalkaskade über *Runx2* (McLarren et al., 2001; Hilton et al., 2008; Javed et al., 2000; Ali et al., 2010).

C-terminal liegt auch ein 31 Aminosäuren langes *nuclear matrix targeting signal* (NMTS) und ist die einzige Runx2-Domäne deren Struktur neben der runt-Domäne aufgeklärt wurde (Tang, 1999; Zeng, 1997). Die NMTS ist für die Lokalisation von Runx2 in diskreten Arealen des Zellkerns verantwortlich und ermöglicht die Bildung von osteoblastenspezifischen, genregulatorischen Komplexen an der nukleären Matrix (Zaidi et al., 2001; Javed et al., 2005; Zaidi et al., 2004).

All diese Faktoren und Funktionen beeinflussen Runx2 in seiner Rolle als Transkriptionsfaktor. Viele zeigten, dass sie bei einer Fehlfunktion an der Entstehung von Knochenfehlbildungen, vorweg durch eine Störung der Osteoblastendifferenzierung, beteiligt sind. Dies verdeutlicht die zentrale Rolle von Runx2 in der Intergration verschiedenster Signale in das genregulative Netz der Osteoblastenentwicklung.

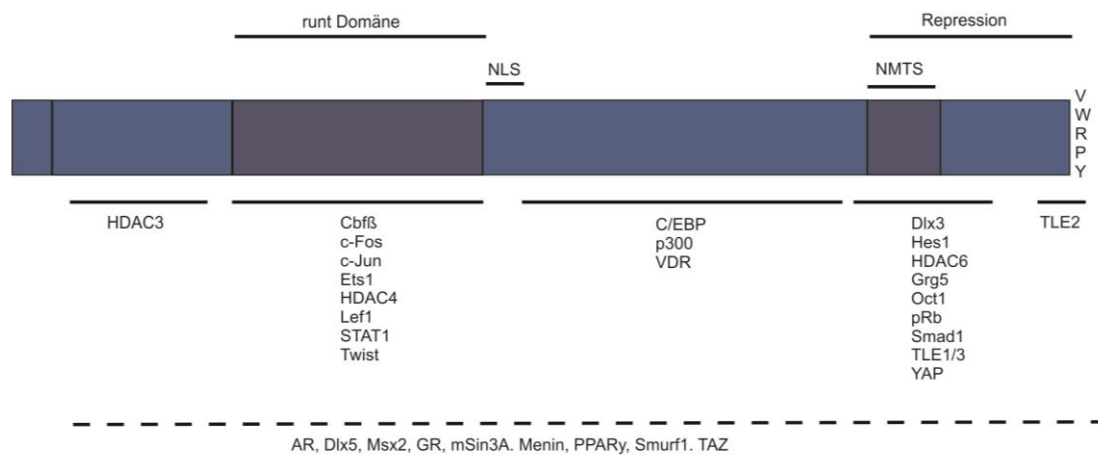


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung von Runx2 mit seinen Proteindomänen und Interaktionspartnern. Die runt-DNA-Bindedomäne interagiert mit Twist-Proteinen, Msx2 und anderen Kofaktoren. Auf die runt-Domäne folgt das nukleäre Lokalisationssignal (NLS). Das C-terminale Ende besteht aus dem nukleären Matrix Targeting Signal (NMTS) und dem VWRPY-Motiv und vermittelt vorwiegend inhibitorische Interaktionen mit TLE- und Hes-Transkriptionsfaktoren.

1.3.2 Msx2 und seine Funktion in der Knochenentwicklung

Die Funktion des Transkriptionsfaktors *Muscle segment Homeobox 2* (*Msx2*) in der Skelettentwicklung wurde durch Satokata et al. (2000) in *Msx2*-defizienten Mäusen untersucht (Satokata et al., 2000). Diese zeigen eine ausgeprägte Osteochondrodystrophie der Calvaria und den Knochen der Extremitäten. Im Schädel adulter *Msx2*^{-/-} Mäuse erstreckt sich eine deutliche Öffnung über beide Frontalknochen. Außerdem sind Femur und Tibia verkürzt und weisen einen dünneren Kompaktknochen sowie kürzere Wachstumsfugen auf. Einhergehend mit dem reduzierten Knochenaufbau sind die Expressionen von osteoblastenspezifischen Markergenen wie z.B. *Runx2*, *Osteocalcin* oder *Alkaline Phosphatase 2* vermindert (Satokata et al., 2000). Neben der Expression in der Calvaria konnte für *Msx2* eine Expression in den proliferierenden

Chondrozyten des Gelenkknorpels, im Perichondrium bzw. Periost, sowie in den Präosteoblasten und Osteoblasten des Femurs und der Tibia nachgewiesen werden (Satokata et al., 2000).

Msx2-Mutationen in der Knochenentwicklung

Msx2 bindet die DNA über eine Homöodomäne, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie zu anderen Homöoboxfaktoren in die Subklasse der *msh-like*-Homöoboxgene eingeordnet wird (Gehring et al., 1994a) (Abbildung 1.4). Über ihre Homöodomänen bilden *Msx*-Proteine auch Heterodimere mit Homöobox-Faktoren und anderen Proteinen (Wolberger, 1996; Zhang et al., 1997). Viele *missense*-Mutationen in der Homöobox führen zu einer Störung der Interaktionen mit der DNA oder Proteinen und führen zu genetischen Erkrankungen (D’Elia et al., 2001). Das autosomal dominant vererbte Foramina parietalia (PFM) ist mit Mutationen in *MSX2* assoziiert (Garcia-Miñaur et al., 2003; Mavrogiannis et al., 2006; Wuyts et al., 2000) und zeigt ein ähnliches Erscheinungsbild wie *Msx2*-defiziente Mäuse. Allerdings ist PFM durch eine Öffnung im Parietalknochen und nicht im Frontalknochen gekennzeichnet (Satokata et al., 2000). PFM ist assoziiert mit bislang neun bekannten intragenischen Mutationen in *MSX2* sowie einer Deletion, die das gesamte Gen betrifft (Mavrogiannis et al., 2006). Aufgrund dieser PFM-assozierten *MSX2*-Deletion wurde den Mutationen ein Funktionsverlust zugesprochen.

Unter den mit PFM assoziierten Mutationen befinden sich zwei *missense*-Mutationen, die zu einer Aminosäuresubstitution in der *MSX2*-Homöodomäne führen. Die eine Mutation führt zum Austausch des Leucins an Position 154 durch ein Prolin (Wuyts et al., 2000) (Abbildung 1.4). Die andere Mutation bewirkt eine Substitution von Arginin durch Histidin an Position 172 (Wilkie et al., 2000; Wuyts et al., 2000). Eine weitere *missense*-Mutation in der Homöodomäne von *MSX2* führt zu einem Histidin an Position 148 anstelle eines Prolins. Anders als die vorgenannten Mutationen ist die P148H-Mutation mit der *Boston-type*-Craniosynostose assoziiert, die durch eine vorzeitigen Verknöcherung einer oder mehrerer Knochennähte des Schädels beschrieben ist und damit einen funktionell gegenteiligen Pathomechanismus zur PFM darstellt (Jabs et al., 1993). Funktionelle Untersuchungen der P148H-Mutation in transgenen Mäusen (Liu et al., 1995; Winograd et al., 1997) sowie *in vitro* (Ma et al., 1996) zeigten, dass diese Mutation tatsächlich einen *Msx2*-Funktionsgewinn zur Folge hat. Dies äußert sich zum einen in einer vergrößerten Anzahl von proliferativen Osteoblastenvorläufern in transgenen Tieren und zum anderen in einer verstärkten DNA-Bindung der Homöodomäne *in vitro*.

Sowohl die in den Mutationen substituierten Aminosäuren als auch deren Positionen innerhalb der *msh*-Homöodomäne sind konserviert innerhalb der Metazoen (Gehring et al., 1994a; Takahashi et al., 2008), aber keine dieser Positionen ist in die direkte DNA-Motiverkennung involviert (Hovde et al., 2001; Gehring et al., 1994b). Die Homöodomäne wird unterteilt in einen aminoterminalen Teil, Helix I, II und III (Qian et al., 1989). Die Helix III vermittelt

maßgeblich den spezifischen Basenpaarkontakt in der großen Furche der Doppelhelix. Sie bildet zusammen mit der Helix II ein *Helix-Turn-Helix*-Motiv, und dessen Konfirmation ist für die Stabilität der Homöodomäne und den Kontakt zu den Nukleotiden der großen Furche von großer Bedeutung (Billeter, 1996; Gehring et al., 1994b). Dieser Kontakt der beiden Helices wird auch durch das Arginin R172 (R31 bezogen auf die Homöodomäne) vermittelt, das in der Helix II liegt. Dessen Seitengruppen binden zudem die Phosphatgruppen der Nukleotide in der kleinen Furche und haben damit einen unspezifischen DNA-Kontakt. Auch der N-terminale Teil der Homöodomäne, in dem das Prolin P148 liegt (P7 bezogen auf die Homöodomäne), vermittelt unspezifischen DNA-Kontakt zur kleinen Furche.

Als *missense*-Mutationen beeinträchtigen die drei genannten Mutationen nicht die Transkription oder Synthese von MSX2. Es bleibt daher unklar, in welcher Art und Weise sie die natürliche *in vivo*-Funktion von MSX2 als Transkriptionsfaktor beeinträchtigen.

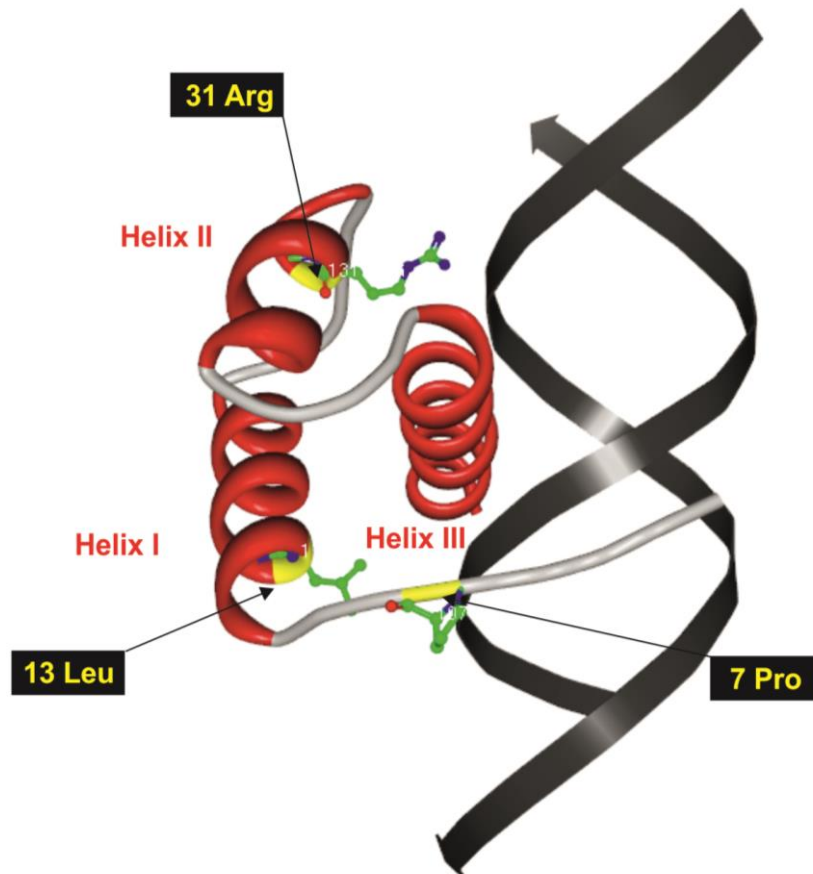


Abbildung 1.4 3D-Struktur der Homöodomäne von Msx1. Helix I, II und III sind in Rot dargestellt. Die zu Msx2 analogen Aminosäuren Prolin an Position 148 bzw. 7 der Homöodomäne (7 Pro), Leucin-154 bzw. 13 der Homöodomäne (13 Leu) und Arginin-172 bzw. 31 der Homöodomäne (31 Arg) sind in Gelb dargestellt, die zugehörigen Atome und Bindungen der Seitenketten in Grün. Die Helix III liegt in der großen Furche der Doppelhelix (anthrazit). Das Prolin-7 liegt im N-terminalen Teil, der die kleine Furche der Doppelhelix kontaktiert. Leucin-13 liegt am Anfang der Helix I und Arginin-31 in der Helix II.

1.3.3 Twist-Proteine und ihre Funktion in der Knochenentwicklung

Das Saethre-Chotzen-Syndrom zeichnet sich durch eine Craniosynostose aus, mit der Mutationen in *TWIST1* assoziiert sind und von denen viele zu einem vorzeitigen Translationstop und damit zum Verlust der sogenannten Twistbox führen (Gripp et al., 2000). Die Twistbox bildet das C-terminale Ende der basischen Helix-Loop-Helix (bHLH)-Transkriptionsfaktoren Twist1 und Twist2, ist vollständig konserviert und interagiert mit Runx2 (Bialek et al., 2004). Für Twist1 existiert ein Mausmodell mit einer Mutation in der Twistbox, die zu einer Substitution des Serins an Position 192 durch ein Prolin führt. Sie führt zu einer deutlichen Reduktion der Interaktion mit Runx2 und löst in Mäusen eine beschleunigte Osteoblastendifferenzierung aus (Bialek et al., 2004). Mäuse, die eine heterozygote S192P-Mutation tragen, entwickeln eine Craniosynostose und Polydaktylie (Bialek et al., 2004).

Als bHLH-Transkriptionsfaktoren erkennen Twist-Proteine über ihre DNA-bindenden Domänen das E-box-Motiv mit den Nukleotiden CANNTG. Im Gegenteil zu den oben genannten Mutationen in der DNA-bindenden Domäne von *MSX2* handelt es sich bei der S192P-Substitution in der Twistbox um die Mutation in einer Protein-interagierenden Domäne eines Transkriptionsfaktors. Der starke Effekt dieser Mutation in Mäusen wirft die Frage auf, ob diese Mutation auch die DNA-bindende Funktion beeinträchtigt oder verändert.

1.3.4 Interaktionen zwischen Runx2, Msx2 und Twist-Proteinen

Sowohl *Msx2* als auch Twist-Proteine regulieren die Proliferation von Osteoblasten und blockieren deren Differenzierung (Bialek et al., 2004; Ishii et al., 2003; Dodig et al., 1999; Satokata et al., 2000), während *Runx2* diese einleitet (Ducy et al., 1997; Otto et al., 1997; Komori et al., 1997). Twist1 und Twist2 sind während der Entwicklung zusammen mit *Runx2* exprimiert, doch erst wenn die Expression der Twist-Transkripte zurückgeht, beginnen die Zellen zu differenzieren (Bialek et al., 2004). Eindrücklich zeigen genetische Untersuchungen, dass sowohl der Funktionsverlust von Twist1 als auch von Twist2 den *Runx2*^{+/-}-Phänotypen aufheben kann (Bialek et al., 2004): Heterozygote *Twist1*^{+/-}-Mäuse entwickeln eine Craniosynostose (El Ghouzzi et al., 1997), doch in einem *Runx2*-heterozygoten Hintergrund entwickelt sich die Schädeldecke vollkommen unauffällig; der homozygote Verlust von *Twist2* behebt die Hypoplasie der Schlüsselbeine. Twist-Proteine gelten daher als Inhibitoren der *Runx2*-Funktion in Osteoblasten.

Auch für *Msx2* konnte eine inhibitorische Wirkung auf die *Runx2*-Funktion *in vitro* gezeigt werden (Shirakabe et al., 2001; Hjelmeland et al., 2005). *Msx2* interagiert mit *Runx2*, vermutlich über die runt-Domäne, und verhindert dadurch die Regulation von Reporterkonstrukten durch *Runx2*. In *Msx2*-defizienten Mäusen ist die *Runx2*-Expression in

den Anlagen der Schädeldecke stark reduziert, da durch den *Msx2*-Funktionsverlust weniger osteogene Zellen vorhanden sind, die später einmal *Runx2* exprimieren (Ishii et al., 2003; Han et al., 2007). Kürzlich wurde eine Mikroduplikation in der Nähe des humanen *MSX2*-Lokus identifiziert, die vermutlich zu der Entwicklung einer Cleidocraniale Dysplasie führt; dies könnte ein weiteres Indiz für einen genetischen Zusammenhang von *Runx2* und *Msx2* sein (Ott et al., 2012).

In genetischen Experimenten mit *Msx2*- und *Twist1*-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass beide die Proliferation der mesenchymalen Osteoblastenverläufer der Calvaria regulieren und sich gegenseitig positiv beeinflussen (Ishii et al., 2003).

Die Untersuchungen der Interaktion zwischen *Runx2*-, *Msx2*- und *Twist*-Proteinen zeigten bereits die gegenseitige Beeinflussung der Funktionen in der Genregulation der Knochenentwicklung. Alle Faktoren sind hoch konserviert und bereits häufig Bestandteil von Untersuchungen im Rahmen der Knochenbildung gewesen. So werden unter den Zielgenen dieser Transkriptionsfaktoren vermutlich weitere essentielle Faktoren sein, die sich in das genregulative Netzwerk der chondrogenen und osteogenen Differenzierung eingliedern lassen und weitere Aufschlüsse über die zugrunde liegenden Mechanismen aus Protein- und DNA-Interaktionen liefern können.

1.3.5 Signaltransduktionskaskaden in der molekularen Entwicklung des Skeletts

An der Regulation der Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten sind viele verschiedene Signaltransduktionskaskaden beteiligt. So gehören der BMP-Signalweg, der Wnt-Signalweg und auch der Hedgehog-Signalweg zu den wichtigsten beschriebenen, und alle stehen im regulativen Zusammenhang mit *Runx2* (Abbildung 1.5) (zusammengefasst in Long, 2012; Schroeder et al., 2005).

Vor einiger Zeit wurde auch der Notch-Signaltransduktionsweg in direkten Zusammenhang mit der Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten gebracht und ist seitdem in diesem Kontext Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Crowe et al., 1999; Kamath et al., 2002; Pan et al., 2005; Oldershaw et al., 2008; Hilton et al., 2008; Dong et al., 2010; Kohn et al., 2012; Dishowitz et al., 2012; Yen et al., 2010).

Die Notch-Signalkaskade ist an vielen entwicklungsbiologischen Prozessen wie der lateralen Inhibition, der Bestimmung einzelner Zellschicksale und an dem Etablieren von Grenzen während der Musterbildung beteiligt (Bray, 2006; Artavanis-Tsakonas, 1999; Crowe et al., 1998; Fortini, 2009).

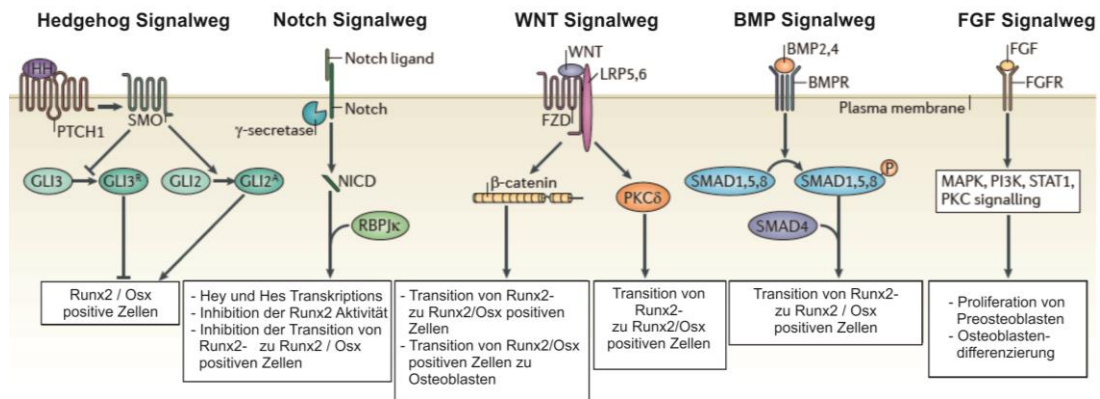


Abbildung 1.5 Signaltransduktionskaskaden mit einer Rolle in der Osteoblastendifferenzierung. Die Abbildung zeigt verschiedene Signaltransduktionskaskaden und ihre Funktionen in der Osteoblastendifferenzierung im Zusammenhang mit Runx2. Für jeden Signalweg sind einige der typischen Proteine aufgeführt, die eine Rolle in der Weiterleitung des jeweiligen Signals haben (Verändert nach Long, 2012).

Sie gilt als eine der ursprünglichsten Signalkaskaden, da sie die Einzige ist, die keine weiteren Botenmoleküle benötigt, um ein ankommendes Signal in den Zellkern zu übermitteln: Diese Aufgabe übernimmt der membranständige Rezeptor Notch selber. Die Aktivierung des Signalwegs geschieht durch die Bindung eines ebenfalls membranständigen Liganden an den Rezeptor und erfordert somit einen Zell-Zell-Kontakt zwischen Signalsender und Signalempfänger (Abbildung 1.6) (Fortini, 2009). Die Liganden des Notch-Signalwegs werden als DSL-Gruppe zusammengefasst und bestehen vornehmlich aus den Delta-like- (Dli) und Jagged- (Jag) Paralogen. Die Bindung der Liganden an Notch bewirkt die gamma-Secretase-abhängige Spaltung des Rezeptors auf der intrazellulären Seite der Membran und die Freisetzung der intrazellulären Domäne des Notch-Rezeptors (Notch-ICD, NICD). Die Notch-ICD gelangt direkt in den Zellkern und reguliert zusammen mit verschiedenen Kofaktoren (CSL-Faktoren, Abbildung 1.6) unmittelbar die Gentranskription. Die regulierten Zielgene des Notch-Signalwegs sind vor allem die basischen *Helix-Loop-Helix*- (bHLH) Transkriptionsfaktoren der *Hairy/Enhancer of split- (Hes)* und *Hey- (Hes related with YRPW Motiv)* Genfamilie. Diese wirken vor allem als Repressor der Gentranskription. Von Hey1 und Hes1 wurde gezeigt, dass sie mit Runx2 interagieren können und dessen genregulative Aktivität verhindern (Hilton et al., 2008; Garg, 2006; Ali et al., 2010).

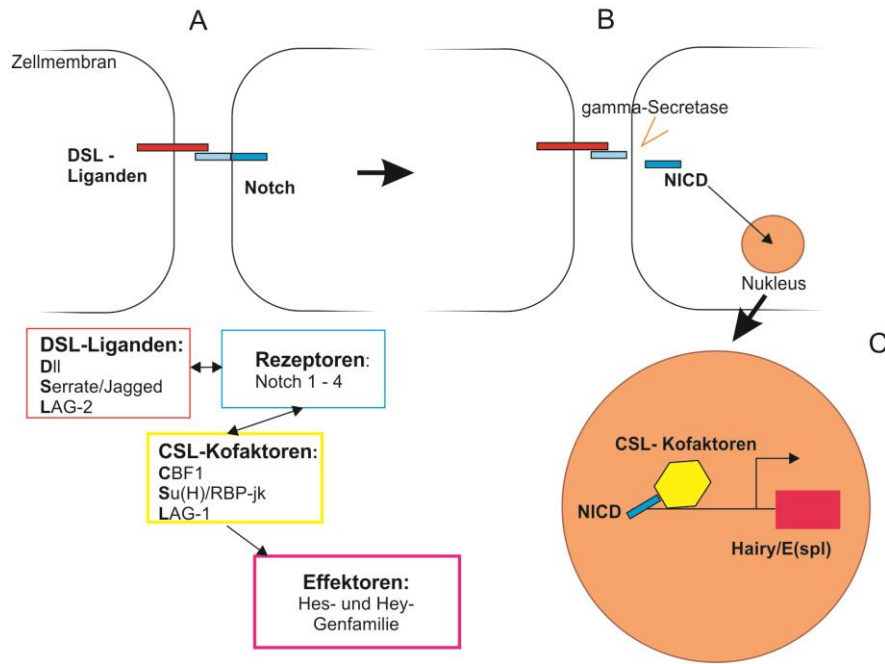


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Notch-Signaltransduktionskaskade. Die Bindung des membranständigen DSL-Liganden an den ebenfalls membranständigen Notch-Rezeptor (A) bewirkt die gamma-Secretase-abhängige Spaltung des Rezeptors mit der Freilassung der intrazellulären Domäne (NICD) (B). Diese gelangt in den Zellkern und aktiviert zusammen mit den Kofaktoren (CSL-Kofaktoren) die Transkription der *Hes*- und *Hey*- Genfamilie (C).

1.4 Genomweite Analysen von Transkriptionsfaktoren

Lange war es nur möglich, einzelne Ziele von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, für die bereits Hinweise auf eine Bindung des zu untersuchenden Faktors vorlagen. Potentiell regulierte Promotoren wurden z.B. durch Luziferase-Reporter-Konstrukte untersucht oder die Bindung an bestimmte Sequenzen und Motive z.B. mittels EMSAs (*electrophoretic mobility shift assay*) bestimmt. Um die Genregulation und die zugehörigen genregulativen Netzwerke zu verstehen, wird ein genomweites Bild auf *cis*-regulatorische Elemente und die sie bindenden Transkriptionsfaktoren benötigt.

Mit Hilfe der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) ist es inzwischen möglich, genomweit alle Bindungsstellen eines Transkriptionsfaktors zu ermitteln sowie deren bevorzugte Erkennungssequenzen in der DNA und auch *cis*-regulatorische Regionen zu identifizieren.

1.4.1 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) nutzt Antikörper, die an mit der DNA quervernetzte Proteine binden und dann als Antikörper-Chromatin-Komplexe isoliert werden können. Die so

präzipitierte DNA kann aus dem Chromatin-Komplex isoliert und identifiziert werden. Für eine genomweite Analyse kann die DNA auf Chips hybridisiert (ChIP-Chip) oder sequenziert werden (ChIP-seq) (Barski and Zhao, 2009). Die Spezifität des Antikörpers bestimmt dabei die Art der präzipitierten Protein-DNA-Komplexe, z.B. Transkriptionsfaktoren oder modifizierte Histone.

ChIP-Chip

Der erste Versuch, Chromatin-Immunpräzipitation genomweit zu analysieren, war das Hybridisieren von präzipitiertem Chromatin auf Microarrays, die Sonden für die zu untersuchenden DNA-Bereiche tragen (ChIP-Chip). Dieses Verfahren hat allerdings oft eine geringe Auflösung, da es durch die Kapazität des Trägers (Chips) begrenzt ist. Das Genom vieler Organismen wird daher nicht vollständig erfasst. Dies hat zur Folge, dass nicht alle von einem Transkriptionsfaktor gebundenen Sequenzen detektiert werden können. Viele Mutationen liegen in intergenischen cis-regulatorischen Elementen und entgehen der Analyse mittels ChIP-Chip. Ganz abgesehen davon stehen Genome vieler Spezies überhaupt nicht als Arrays zur Verfügung, und so ist die Möglichkeit der Durchführung solcher Analysen auf wenige Modelorganismen begrenzt bzw. aufwendig.

ChIP-seq

Erst die Kombination von Chromatin-Immunpräzipitation und der Next-Generation-Sequenzierung (ChIP-seq) brachte eine vollständige Erfassung der präzipitierten DNA. Von den ca. 200 - 300 Basenpaar großen, präzipitierten DNA-Doppelstrang-Fragmenten werden viele Millionen Fragmente parallel am 5'-Ende ansequenziert, wodurch kurze Sequenzen (*Reads*) entstehen. Diese *Reads* werden dann auf das entsprechende Referenzgenom kartiert. Je häufiger ein Fragment präzipitiert, also gebunden wurde, desto häufiger wird es sequenziert und desto häufiger im Genom kartiert. Dadurch entstehen *Read-Anreicherungen*, sogenannte *Peaks*, die

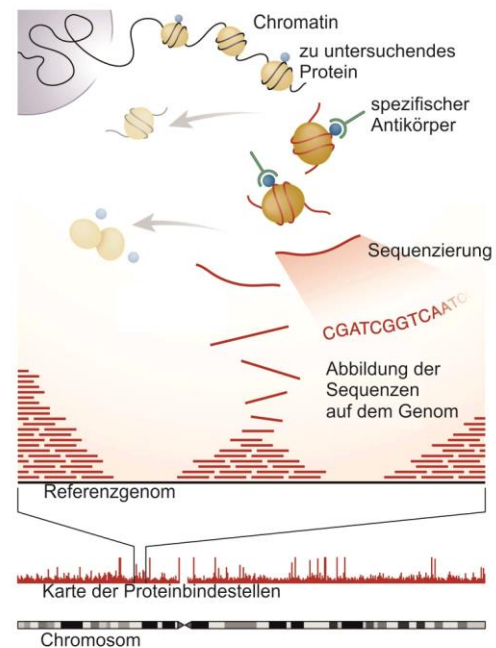


Abbildung 1.7 Schematische Darstellung von ChIP-seq. Bild verändert nach <http://www.bnl.gov/newsroom/news.php?a=11351>

im Falle einer Transkriptionsfaktor-DNA-Bindung den Ort der Bindung flankieren (Abbildung 1.7). Diese Anreicherungen können mit Hilfe von Algorithmen detektiert werden. Dabei wird die Signifikanz der *Read*-Anreicherung berechnet, die genomischen Koordinaten der wahrscheinlichen Protein-Bindung ermittelt und als sogenannte *Peaks* dargestellt. Der Vergleich aller *Peaks* eines Transkriptionsfaktors ermöglicht zudem die Ermittlung überrepräsentierter Sequenzen (Motive) in den gebundenen DNA-Bereichen, die potentielle Erkennungssequenzen des untersuchten Transkriptionsfaktors sind.

1.4.2 Vergleich von Transkriptionsfaktoren mittels ChIP-seq

Durch die zunehmenden Kapazitäten der Next-Generation-DNA-Sequenzierung können ChIP-seq-Analysen inzwischen in größerer Zahl durchgeführt werden. Neben der Untersuchung vieler verschiedener Faktoren in Zelllinien, die wichtige Erkenntnisse zu ihrer Funktion in den Zellen liefern (Gerstein et al., 2012; Yip et al., 2012; Whitfield et al., 2012), können ChIP-seq-Experimente auch Hinweise zur Evolution von Transkriptionsfaktoren und ihren Zielgenen liefern (Schmidt et al., 2010; Spivakov et al., 2012). Die Durchführung von ChIP-seq-Analysen für einen Transkriptionsfaktor und Mutanten dieses Transkriptionsfaktors könnte, durch den Vergleich der Bindungsprofile von Wildtyp und Mutante, neue Hinweise auf die funktionellen Auswirkungen und damit den Pathomechanismus der Mutation bringen.

1.5 Hühner-Micromasskulturen als Modell der Chondro- und Osteogenese

Die Hühner-Micromasskultur ist ein zellkulturbasiertes Modell der Knorpeldifferenzierung. Durch die Einfachheit und leichte Verfügbarkeit dieses Modellsystems bietet es sich für die Untersuchung von molekulargenetischen Fragestellungen zur Knorpel- und Knochenentwicklung an. Die Hühner-Micromasskultur besteht aus primären mesenchymalen Zellen, die aus der frühen Extremitätenknospe von Hühnerembryonen gewonnen und in einer hohen Zelldichte ausgesät werden. Über einen Zeitraum von mehreren Tagen durchlaufen die Zellen im Zentrum der Kultur, wo sie kondensiert in höchster Dichte vorliegen, spontan die verschiedenen Stadien der Chondrogenese. Es bilden sich viele kleine kugelartige Areale, innerhalb derer die Zellen dann zu hypertrophen Chondrozyten differenzieren. Dabei sezernieren sie Knorpelmatrix, die sich anhand einer Alcian-Blau-Färbung nachweisen lässt. Die Zellen in der Peripherie hingegen durchlaufen eine eher Osteoblasten-typische Differenzierung. Eine Bildung von Knorpelmatrix bleibt aus, aber dafür zeigen sie zunehmende Aktivität der Alkalischen Phosphatase, die sich ebenfalls mit Hilfe einer Färbung nachweisen lässt und ein Marker für frühe Osteoblasten ist.

1.5.1 Untersuchungen von Transkriptionsfaktoren in Hühner-Micromasskulturen

Ein weiterer Vorteil der Hühner-Micromasskulturen ist, dass Hühnerzellen mit Hilfe des replikationskompetenten Retrovirus RCASBP (Replication-Competent Avian sarcoma-leukosis virus, with Splice acceptor, Bryan RSV Pol) (Hughes et al., 1987; Hughes, 2004) leicht zu infizieren sind und Infektionsraten von annähernd 100% erreicht werden. Somit können z.B. Gene für Transkriptionsfaktoren überexprimiert und deren Einfluss auf die Zelldifferenzierung analysiert werden (Seemann et al., 2009; Villavicencio-Lorini and Kuss, 2010). Ein weiterer Vorteil der retroviral vermittelten Expression, der in dieser Arbeit genutzt wurde, ist die Möglichkeit, die exprimierten Gene mit Epitopen zur Nutzung hochaffiner Antikörper zu versehen. Dies bietet die Möglichkeit der Nutzung standardisierter Protokolle. Für die Chromatin-Immunpräzipitation stellt dies einen wichtigen Vorteil dar, da deren Erfolg stark von der Affinität der Antikörper zu ihren Epitopen abhängt. Auf diese Weise könnten sich funktionelle Vergleiche von Transkriptionsfaktoren und deren Varianten effizienter untersuchen lassen (Abbildung 1.8).

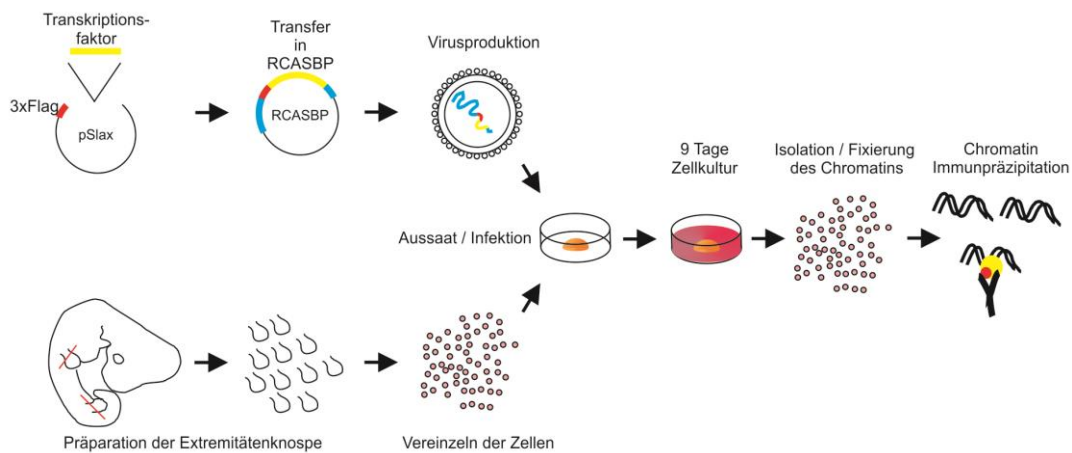


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung der Präparation von Hühner-Micromasskulturen und Überexpression 3xFlag-fusionierter Transkriptionsfaktoren für die Chromatin-Immunpräzipitation unter Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers. Die Sequenz eines Transkriptionsfaktors wird in den pSlax-Vektor integriert zur Koppelung an eine 3xFlag-Sequenz. als Fusionsprodukt wird in den retroviralen Vektor RCASBP transferiert und Viruspartikel produziert. Parallel werden die Extremitätenknospen von Hühnerembryonen frei präpariert und die mesenchymalen Zellen vereinzelt. Bei Aussaat der Mikromasse aus Zellen werden diese mit Viruspartikeln infiziert. Die Kultivierung der Zellen läuft über neun Tage. Danach werden die Zellen wieder vereinzelt, das Chromatin fixiert und anschließend für die Immunpräzipitation unter Verwendung eines Anti-Flag-Antikörpers eingesetzt.

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit soll ein Ansatz erarbeitet werden, um Funktion und Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren des genregulativen Netzwerkes der Knochenentwicklung genomweit zu untersuchen. Das Hauptinstrument für diese Untersuchungen ist die Chromatin-Immunpräzipitation mit anschließender Sequenzierung durch *next generation sequencing* (ChIP-seq). ChIP-seq ermöglicht eine nicht gerichtete Untersuchung von Zielgenen *in vivo*, ohne vorherige Hinweise auf eine mögliche Regulation. Die Auswertung von ChIP-seq-Experimenten ist immer noch eine Herausforderung aufgrund der Spezifität von Antikörpern und tausenden gebundenen Sequenzen genomweit.

Es soll daher die Möglichkeit geprüft werden, potentielle Zielgene zweier in der Skelettentwicklung essentieller Transkriptionsfaktoren RUNX2 und MSX2 zu identifizieren, indem ChIP-seq-Analysen von mit einem FLAG-Epitop versehenen Varianten in Hühner-Micromasskulturen – einem Zellkultur-basierten Modellsystem für die Knorpel-differenzierung – durchgeführt werden.

Zum anderen soll mittels ChIP-seq die DNA-Bindungseigenschaften von Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Mutationen vergleichend untersucht werden, um Aufschlüsse über mögliche Pathomechanismen der assoziierten humangenetischen Erkrankung zu gewinnen sowie über vergleichende Analysen neue Informationen über Transkriptionsfaktor-DNA-Interaktionen zu erhalten. Hierfür soll MSX2 und der Missense-Mutationen in der DNA-bindenden Homöodomäne untersucht werden, insbesondere da die Rolle der DNA-Bindung von MSX-Proteinen während der Genregulation noch nicht vollständig verstanden ist. Als eine weitere Möglichkeit soll geprüft werden, inwiefern sich mittels ChIP-seq Kofaktor-abhängige DNA-Bindung untersuchen lässt. Dafür soll eine Mutation in der RUNX-bindenden Domäne von TWIST2 mittels ChIP-seq untersucht werden und primär überprüft werden, in wie weit sich eine mögliche Veränderung der Runx-assoziierten DNA-Bindung beobachten lässt.

2 Material

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden – soweit nicht anders vermerkt - in dem Reinheitsgrad „zur Analyse“ eingesetzt und von den Firmen Merck KgaA (Darmstadt), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) und Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen.

2.2 Lösungen und Puffer

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Lösungen und Puffer nach Sambrook und Russell (2001) (Sambrook and Russel, 2001) angesetzt.

2.3 Enzyme

Die Enzyme zur Modifikation von DNA (Restriktionsenzyme, T4 DNA-Ligasen, Polynukleotidkinase etc.) wurden von Fermentas (jetzt Thermo Scientific, St. Leon-Roth), New England Biolabs (Frankfurt) und Promega (Mannheim) bezogen.

2.4 Bakterien

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

E. coli Top10 (Invitrogen)

2.5 Zelllinien

Siehe Abschnitt 3.2.6

2.7 Kits

Kit	Hersteller
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond PC100	Macherey-Nagel, Düren
Nucleobond PC100 EF	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
TaqMan Reverse Transcription Reagents	Roche/Applied Biosystems, Branchburg, USA
BigDye Terminator v3.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Dual-Glo Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
BCA Protein Assay Kit	Pierce/Thermo Fisher Scientific, Bonn
RNAeasy-Kit	Quiagen, Hilden
ChIPseq Library Prep E6240	NEB, Frankfurt a.M.
Vectastain IgG Mouse ABC Kit	Biozol, Eching
Peroxidase Substrate Kit DAB SK-4100	Vector Laboratories, Birmingham. CA, USA

2.8 Sonstige Geräte

Geräte	Hersteller
Zentrifugen und Rotoren	
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplattenzentrifuge 5416	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
L7-55 Ultrazentrifuge	Beckman, Palo Alto, USA
Rotor SW 32 Ti	Beckman, Palo Alto, USA
Avanti J-E Centrifuge	Beckman Coulter, Palo Alto, USA
Rotor JLA 16250	Beckman Coulter, Palo Alto, USA
Thermocycler	
Geneamp 2700 PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Geneamp 9700 PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA

Material und Methoden

ABIPrism HT 7900 Realtime Cyclers	Applied Biosystems, Foster City, USA
<hr/>	
Luminometer	
MicroBeta TriLux 1450	Wallac, Turku, Finland
<hr/>	
Mikroskopie	
Mikroskop DMR	Leica, Bensheim
Kamera AxioCam HRc	Zeiss, Göttingen
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Kamera AxioCam MRm	Zeiss, Göttingen
Mikroskop DMIL	Leica, Bensheim
Stereomikroskop MZ6	Leica, Bensheim
Stereomikroskop MZ7-5	Leica, Bensheim
Kamera AxioCam MRc5	Zeiss, Göttingen
Kaltlichtquelle KL1500 LCD	Leica, Bensheim
Software Axiovision 4.x	Zeiss, Göttingen
<hr/>	
Histologie	
Microtom Cool Cut HM355S	Microm, Walldorf
Einbettstation EC 350-1 & 2	Microm, Walldorf
<hr/>	
Sonstige	
Genome Analyzer IIx	Illumina, CA, USA
Bioruptor UCD-300	Diagenode, Belgien
Bioanalyzer 2100	Agilent, Böblingen
Nanodrop	Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA
Brutschrank BSS 300	Ehret GmbH & Co.KG Emmendingen
Thermomixer	Eppendorf

2.9 Primer

Alle in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der MWG Biotech AG (Ebersberg) synthetisiert und per HPSF aufgereinigt.

Tabelle 2.1 Verwendete Plasmid-Standardprimer.

Plasmid-Standardprimer		
Primername	Sequenz 5'-3'	Bemerkung
T7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	
Sp6 Promoter	CATTTAGGTGACTATAG	
T3 Promoter	AATTAACCCTCACTAAAGGG	
RCAS 5' Seq	TCCATCAGCTACCACACGGAA	
RCAS 5' (86f)	ACGCTTTTGTCTGTGTGCTGC	
Sub-RCAS-A-f	CAGACCACAAGGGGTTCT	Subtypisierung RCASBP-A
Sub-RCAS-B-f	CCCAAATGAGACAGAATTGGT	Subtypisierung RCASBP-B
Sub-RCAS-rev	GTAGCGCTTTTGGTTTGGTG	Subtypisierung RCASBP-A / -B
Sub-RCAS-rev2	ATCCAGGTGTGAGGTGCTTC	Subtypisierung RCASBP-A / -B
RV Primer 3	CTAGCAAATAGGCTGTCCC	
pGL4 rev	CCGTCTTCGAGTGGGTAGAA	

Tabelle 2.2 Primer für Klonierungen in pSlax.

pSlax-Klonierungen (Absatz 2.10.1)			
Zielgen	5'-3' Sequenz (vorwärts)	5'-3' Sequenz (rückwärts)	NCBI Referenz (<i>G.gallus</i>)
<i>TWIST2</i>	GACGTCTCCCATGGAAGAAAGCTC CAGTTCTC	GACGTCTCGAATTCTAGTGTGAGG CCGACATGG	NM 204679.1
<i>RUNX2</i>	GACGTCTCCCATGGCATCAAACAG CCTCTTCAGC	GACGTCTCGAATTCTCAGTACGGC CTCAAACG	NM 204128.1
<i>NICD2</i>	GAGGTCTCCCATGAAGCGTAAGCG CAAGCAC	GAGGTCTCGAATTCTCAGGCGTAC ACCTGCATGT	NM 001252033.1
<i>MSX2</i>	GACGTCTCCCATGGCTTCTCCTTCC AAAGC	GACGTCTCGAATTCTTAAGATAAG TGGTACATGCTATATCCG	NM 204559.1

Tabelle 2.3 Primer für Mutagenesen.

Mutagenese-Primer			
TWIST2 S149P	GAGTTATGCCTTCCCAGTCTGGAGG ATG	CATCCTCCAGACTGGGAAGGCATA ACTC	NM 204679.1
RUNX2 Q209R	TGACAAATCCCCCGAGTCGCTACA TACCACA	TGTGGTATGTAGCGACTCGGGGG GGATTTGTCA	NM 204128.1
MSX2 P140H	GAAGCCCCGCACCCACTTCACTACTT CCC	GGGAAGTAGTGAAGTGGGTGCGG GGCTTC	NM 204559.1
MSX2 L146P	CTACTTCCCAGCCGCTGGCCCTGGAG	CTCCAGGGCCAGCGGCTGGGAAG TAG	NM 204559.1
MSX2 R164H	GTCCATCGCCGAGCATGCCGAATTCT CCAG	CTGGAGAATTCGGCATGCTCGGCG ATGGAC	NM 204559.1

Tabelle 2.4 Primer für quantitative PCR.

Primer für quantitative PCR (<i>Gallus gallus</i>)		
Zielgen	5'-3' Sequenz (vorwärts)	5'-3' Sequenz (rückwärts)
<i>Gallus gallus</i>		
GAPDH	TGTCCTCTCTGGCAAAGTCC	ACAGTGCCCTTGAAGTGTC
MSX2	CGAGAGAGACTTCTGGTGG	CGGTTGGGTAAGTGCATTCTT
NOTCH2	GCCAACTGCTCCTCTTCACT	GCTGGCATTCAAAGTTGTCA
DLL1	GACCTACCACAGAAAACCC	AGGTCTGGGACCACTCCT
HEY1	GCATCAACAACAGCCTGTCC	ATCTCGGCTTTCTCCAGCTT
WNT5A	CTCCGCTTGGATTACAGCAC	GAGGAGAAGATGGCCAGAGC
RUNX2	GTGGCCAGATTCAATGACCT	CCATCCACCGTCACCTTTAT
CDH2	CACTGTAGAACCAGACGCCA	GGATTGGCCTTTCATCAAGA
IBSP	TCCCATAGCTGCTCTCAGT	GAGGTCACAGCTGGGGA
HES1	AGCACCTGAGGAACCTCCAG	TATTTGCCAGCAGCCTG
BGLAP	CTGCTCACATTCAGCCTCTG	GGGAGATGAAGGCTTTAGCA
SPP1	GCATTCTTTGCTTGTGCTTTATC	GGCATGCTGCCTGGATT
AKP2	ACCAGAAATGTGGCCAAGAAC	GGCAACGTATGGGAAGTGT
COL10A1	GGGCCACCACACTTTCTACC	AGGACCTGGTTGTCTCTTG
COL2A1	CGACATCAAACCTCTGCCATC	TGGTTCGGGTCAATCCAG
COL1A1	TACAACGATAAGGATGTGTGAAAC	GGAGGTGCTCTCGCAGATCA
IHH	GGCTTTGACTGGGTCTACTACGA	CAGCCGAGTGCTCTGACTTG

2.10 Vektoren

2.10.1 pSlax-5'3xFlag-Vektoren

Für die Klonierung der 3xFlag-Sequenz-angehangenen Transkriptionsfaktoren wurde eine veränderte Version des pSlax-13 Vektors (Addgene, Cambridge, MA, USA; verändert durch Jochen Hecht) verwendet. In diesem wurde 5' der *NcoI*-Schnittstelle eine 3x-Flag-Sequenz mit einer Kozak-Sequenz integriert, sowie eine *SpeI*-Schnittstelle (Abbildung 2.1). Kloniert man eine Protein-kodierende Sequenz über die *NcoI*-Schnittstelle und ersetzt dabei das ATG der *NcoI*-Erkennungssequenz mit dem Startkodon (ATG) der jeweiligen Protein-kodierenden Sequenz, entsteht ein durchgehendes Leseraster aus der Fusion des 3xFlag Epitops und der Genkodierenden Sequenz. Als Schnittstelle am 3'-Ende wurden entweder *BamHI* oder *EcoRI* benutzt.

Um das Fusionsprodukt in den viralen Vektor RCASBP zu klonieren, wurde eine *SpeI*-Schnittstelle in den pSlax-13 integriert, so dass dann über einen Doppelverdau mit *ClaI* und *SpeI* das Fusionsprodukt aus dem pSlax geschnitten werden konnte (Abbildung 2.1) Der Zielvektor RCASBP wurde für die Integration des *ClaI* / *SpeI* geschnittenen Konstruktes verändert (Abschnitt 2.10.2).

Diese Klonierungsstrategie wurde für alle hier verwendeten 3xFlag-markierten Transkriptionsfaktoren benutzt. Die Schnittstellen für die Klonierung in den pSlax-Vektor wurden den Primern für die Klonierung angehängt (Tabelle 2.2). Alle 5'-Primer sind mit einer Schnittstelle für *NcoI* und die 3'-Primer mit einer Schnittstelle *BamHI* bzw. *EcoRI*. Versehen. In einigen Fällen wurde aufwärts dieser Schnittstellen eine davor gelegenen Erkennungssequenz für *BsmBI* generiert, welches dann den Überhang einer geschnittenen *NcoI*, *BamHI* oder *EcoRI* Schnittstelle erzeugt.

Mutagenesen von Transkriptionsfaktor-Sequenzen wurden stets in pSlax vollzogen, und danach über einen *ClaI* / *SpeI* Doppelverdau in RCASBP umkloniert.

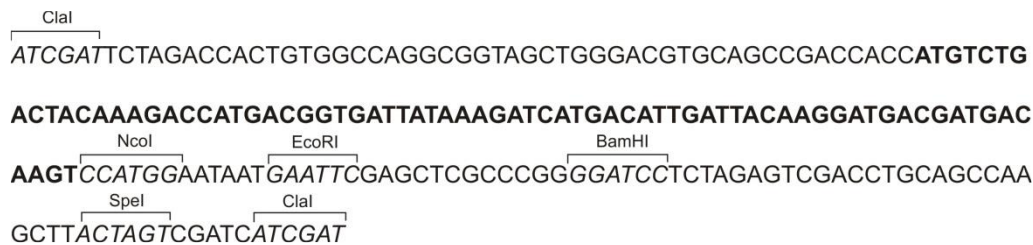


Abbildung 2.1 Sequenzausschnitt des modifizierten pSlax-Vektors. Die Sequenz zeigt die integrierte Sequenz des 3x Flag-Epitops (fett) und Restriktionsschnittstellen (Klammern oberhalb der Sequenz).

2.10.2 RCASBP-Vektoren

Für die retroviral vermittelte Expression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren wurde eine modifizierte Version des RCASBP(A) bzw. (B) - Plasmids (Hughes et al., 1987) verwendet (modifiziert durch Jochen Hecht). Dieser enthält eine *SpeI* Erkennungssequenz abwärts der *ClaI* Erkennungssequenz. So können klonierte Sequenzen über einen *ClaI* / *SpeI* Doppelverdau aus dem modifizierten pSlax-Plasmid (Abbildung 2.1) in den ebenfalls *ClaI* / *SpeI* geschnittenen RCASBP-Vektor integriert werden. Die so entstandenen RCASBP-Klone konnten dann wie unter Absatz 3.2.8 beschrieben in DF-1 Zellen transfiziert werden, um Virus zu produzieren und den gewonnen Virus zur Überexpression jeweiliger Zielgene zur Infektion von Hühnerzellen zu verwenden.

2.10.3 Eukaryotische Expressionsplasmide

Für Transfektionen zur Überexpression von Transkriptionsfaktoren in Luciferase-Reporter-Experimenten wurde der pVAX1 Vektor (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) verwendet.

2.10.4 Reporterplasmide

Für das Klonieren von regulatorischen Sequenzen wurde der pGL4.10 bzw. pGL4.23 Vektor (Promega, Mannheim) verwendet. Als Positivkontrolle für den Erfolg von Luziferase-Reporter-Experimenten wurde zudem das pGL3-*Ihh*-Konstrukt verwendet, welches ein 1,3 kb Fragment des murinen *Indian Hedgehog* Promotors enthält (Yoshida et al., 2004).

2.11 Antikörper

Tabelle 2.5 Auflistung der verwendeten primären und sekundären Antikörper.

	Bezeichnung	Hersteller
Primärantikörper		
rabbit anti-Notch2	ab118824	Abcam, Cambridge, UK
mouse monoclonal anti-Flag M2	F1804	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Rabbit polyclonal anti-trimethyl-Histon H3 (Lys4)	07-473	Millipore, Billerica, MA, USA
Rabbit polyclonal anti-GAPDH (FL335)	sc-25778	Santa-Cruz, Santa-Cruz, CA, USA
Sekundärantikörper		
anti-rabbit-HRP	K4002	Dako, Dänemark
Streptavidin, Alexa Fluor 488	S11223	Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt
Streptavidin, recombinant	11721674001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Extravidin, Cy3	E4142	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
αDIG-AP Fab Fragment	11093274910	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim

2.12 Software

2.12.1 Software zur Analyse der ChIP-seq Daten

Analysen von Sequenzdaten geschahen auf der bioinformatischem Plattform Galaxy (<https://main.g2.bx.psu.edu/>). Diese bietet Standardfunktionen für die Bearbeitung bioinformatischer Datensätze. Außerdem sind dort verschiedene veröffentlichte Programme zur Analyse bioinformatischer Daten eingebettet, die für diese Arbeit verwendet wurden (Tabelle 2.6).

Tabelle 2.6 Verwendete bioinformatische Programme.

Programm	Publikation	Verwendet für
BEDTools	Quinlan AR and Hall IM, 2010	Siehe Absatz 3.5.2
SAMtools	Li H et al 2006	Siehe Absatz 3.5.2
MACS2	Zhang et al. 2008	Siehe Absatz 3.5.2
DREME	Bailey TL 2011	Siehe Absatz 3.5.2
BWA	Li H. und Durbin R. 2009	Siehe Absatz 3.5.1
CentriMo	Bailey and Machanick 2012	Siehe Absatz 3.5.2
TOMTOM	Bailey and Noble 2007	Siehe Absatz 3.5.2

2.12.2 Sonstige verwendete Software

Zur Verwaltung, Darstellung und Modifikation von DNA- und Proteinsequenzen wurde das Softwarepaket Vector NTI (Invitrogen) genutzt.

Primer wurden mit dem im Internet verfügbaren Programm Primer3 (<http://primer3.sourceforge.net/>) generiert.

2.13 Tiere

2.13.1 Hühner

Befruchtete Hühnereier wurden von Lohmann Tierzucht GmbH (Cuxhaven) bezogen und in einem BSS300 Brutschrank (Ehret GmbH & Co. KG, Emmendingen) bei 37,5°C und einer Luftfeuchte von 70 % für den angegebenen Zeitraum bebrütet.

2.13.2 Verwendete Mausstämme

Verwendete „wildtypische“ Mäuse entstammten dem Mausstamm C57Bl6 (erhalten durch Charles River) und Runx2-Mäuse (Otto et al., 1997) wurden im Tierhaus des MPI für molekulare Genetik in Berlin gehalten.

3 Methoden

3.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardtechniken, wie die Klonierung von DNA-Fragmenten, Generierung kompetenter *E.coli*-Zellen, Transformation von *E. coli* und Elektrophorese von Agarosegelen, erfolgten nach Standardprotokollen, wie sie u. a. in Sambrook und Russel (2001) (Sambrook and Russel, 2001) aufgeführt sind.

3.1.1 DNA-Isolierung

Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen (z.B. für Sequenzierungen) wurde der NucleoSpin Plasmid der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Größere Plasmidmengen (Midi) wurden mit dem Kit Nucleobond PC100 von Macherey-Nagel isoliert.

Für Plasmidpräparationen, die in Luciferase-Reporter-Experimenten verwendet wurden, wurde das Endotoxin-freie Nucleobond PC 100 EF von Macherey-Nagel benutzt.

Alle Kits wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt.

Isolierung genomischer DNA

3.1.1.1.1 Isolierung genomischer DNA für Genotypisierung von Mausstämmen

Zur Isolierung genomischer DNA für die Genotypisierung verwendeter Mäuse wurde Biopsiematerial über Nacht bei 55 °C in 0,25ml Proteinase K -Puffer (200 µg/ml Proteinase K in 100 mM Tris/HCl, pH 8;) und weitere 30 Minuten bei 55 °C auf einem Thermoschüttler verdaut. Das verdaute Gewebe wurde bei höchster Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand in einer 1:10 Verdünnung für die Genotypisierungs- PCR eingesetzt.

3.1.1.1.2 Isolierung von genomischer DNA zur Klonierung von Reporterkonstrukten

Genomische DNA höherer Reinheit, z.B. für Klonierungen, wurde von Frau Asita Stiege wie folgt isoliert und gereinigt:

Für die Isolierung von genomischer DNA höherer Reinheit wurden 500mg Gewebestück in 2 ml Lösung A (25 mM EDTA pH 8.0, 75 mM NaCl) und 2 ml Lösung B (10 mM EDTA pH 8.0; 10 mM Tris-HCl pH 8.0; 400 mg/ml Proteinase K; 1% (w/v) SDS) sowie RNase A (Roche,

Endkonzentration 100 µg/ml) vermischt und bei 50°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die DNA zweimal mit gleichem Volumen Phenol, dann zweimal Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (50:49:1) und einmal Chloroform/Isoamylalkohol (49:1) extrahiert. Für die Fällung der DNA wurde diese mit NaCl (Endkonzentration 250 mM) und dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol (RT) versetzt und nachvorsichtigem Schütteln und sofort auf einem Plastikspatel aufgewickelt. Die DNA wurde dann 5 – 10 min an der Luft getrocknet, mit 70 % Ethanol zwei- bis dreimal gewaschen erneut getrocknet bis das Phenol und Ethanol vollständig verdampft sind, und in 100 – 200 µl 0,5-fachem TE über Nacht gelöst.

3.1.2 RNA-Isolierung

Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen wurde das RNAeasy-Kit von Qiagen, Hilden nach Herstellervorgaben verwendet. Das Zellmaterial wurde durch mehrfaches auf- und abpipettieren in RLT-Puffer (siehe Herstellerprotokoll) lysiert. RNA, die nicht sofort aufgereinigt wurde, wurde in RLT-Puffer in flüssigem Stickstoff schockgefroren und danach bei -80°C aufbewahrt.

Gesamt-RNA aus vollständigem tierischem Gewebe wurde zuerst in 1ml PEQGold Trifast (Peqlabs, Erlangen) aufgenommen, dann mit dem Ultra-Turrax T8 zerkleinert und 5 Minuten bei RT inkubiert. Dann wurde die Probe mit 0,2 ml Chloroform versetzt, gut geschüttelt, nochmals 3 Minuten bei RT stehen gelassen und dann 15 Minuten bei 4°C und 13000 rpm zentrifugiert. Zur Isolierung der RNA wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 ml Isopropanol versetzt und 10 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem 15 minütigem zentrifugieren bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand verworfen und das Pellet zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen. Anschließend wurde das Pellet kurz bei RT getrocknet und in 50 – 100 µl DEPC-Wasser gelöst. (Aufbewahrung ab dann bei -80 °C).

3.1.3 Herstellung von cDNA

Herstellung von cDNA für quantitative RT-PCR

Die Synthese von cDNA für die quantitative PCR erfolgte mit dem TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit von Applied Biosystems (Branchburg, USA) nach Anleitung des Herstellers. Eingesetzt wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA und in insgesamt 100 µl Reaktionsvolumen umgeschrieben. Wenn weniger cDNA benötigt wurde, wurde der Reaktionsansatz halbiert und nur 0,5 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Umschreibung erfolgte stets mit *random* Hexamer-Primern.

Herstellung von cDNA für nicht quantitative RT-PCR

Die cDNA für alle nicht-quantitativen RT-PCRs wurde mit SuperScript II (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) nach Anleitung des Herstellers je nach Verwendungszweck mit Oligo(dT) oder *random* Hexamer-Primern hergestellt.

3.1.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Standard-PCR

Standard-PCRs wurden nach allgemeinen Protokollen (Sambrook and Russel, 2001; Müller, 2001) mit *Taq*-, *Pfu*- oder *Phusion*-Polymerase durchgeführt.

Runx2-Genotypisierungs-PCR

Template-DNA aus Biopsiematerial wurde wie unter 3.1.1 beschrieben aufgereinigt.

Reagenzien für einen einfachen Ansatz	
0,5 µl Primer cbfa_11_neu	10 pmol/µl
0,5 µl Primer MCBFA3_korr	10 pmol/µl
0,5 µl Primer Neo_5_neu2	10 pmol/µl
2 µl DMSO	
2,5 µl PCR-Puffer	200 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ ; 0,1 % (v/v) Tween 20; 750 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25 °C
0,5 µl dNTPs	Jeweils 10 mM
0,2 µl Taq	
17,2 µl H ₂ O	

Die PCR wurde in einem GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems) wie folgt durchgeführt:

1 Zyklus	35 Zyklen	1 Zyklus
94 °C 5 min	94 °C 1 min 59 °C 1 min 72 °C 1 min	72 °C 7 min 4 °C ∞

Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die relative Quantifizierung von RNA-Transkripten erfolgte über die Detektion des Farbstoffs SYBR Green I. Dieser Farbstoff bindet spezifisch an doppelsträngige DNA und damit an die synthetisierten DNA-Moleküle in der qRT-PCR Reaktion. Die dabei zunehmende Fluoreszenz wird in Echtzeit detektiert und ist proportional zur Transkriptmenge.

Die qRT-PCR wurde in einem ABIPrism 7900 HT (Applied Biosystems) mit 384-well Platte in 18 µl Reaktionsvolumen durchgeführt.

Ein Ansatz bestand aus: 6 µl cDNA-Verdünnung (s.u.), 3 µl Primermix (je 4,5 pmol Vorwärts- und Rückwärts-Primer) und 9 µl SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Für jede PCR-Reaktion wurde cDNA aus 6 ng RNA verwendet (6 µl der 1:10 verdünnten RT-Reaktion mit 1 µg RNA in 100 µl Volumen, siehe auch Abschnitt 3.1.3). Für jede der verwendete cDNA und Primerkombination wurden Triplikate pipettiert.

Zur Erstellung der Standardkurven wurden insgesamt 5 Verdünnungsstufen aus cDNA hergestellt. Die geringste Verdünnung bestand aus 6 ng cDNA. Jede weitere Verdünnungsstufe wurde im Verhältnis 1:2 verdünnt, so dass in der höchsten Verdünnungsstufe 0,375 ng cDNA verwendet wurden.

3.1.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte mit BigDye v3.1 (Applied Biosystems, USA) nach Vorgaben des Herstellers. Der automatisierte Lauf im Kapillarsequenzierer (3730) DNA Analyzer, Applied Biosystems, Foster City, USA) erfolgte am Institut für Medizinische Genetik der Charité Berlin.

3.1.6 Klonierung der NOTCH2-intrazellulären Domäne (ICD)

Anhand der Angaben von Ong et al., 2006 wurde die homologe Sequenz der Maus-*NOTCH2*-ICD aus *Gallus gallus* cDNA isoliert, mit einem N-terminalen 3xFlag-Epitop (Absatz 2.10.1) versehen und in den RCASBP kloniert. Die Infektion durch die hergestellten Viruspartikel, sowie die Kernlokalisierung wurde mit Hilfe einer immunzytologischen Färbung unter Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers (Absatz 3.2.9) überprüft.

3.1.7 SDS-Polyacrylamidelektrophorese und Western-Blot

Für den immunologischen Nachweis von Notch2 und 3xFlag-NOTCH2-ICD wurden die Proteine in Zelllysaten mithilfe eines SDS-Polyacrylamidgels aufgetrennt. Dieses bestand aus 12 % -igen Trenngelen und 5 % -igen Sammelgelen. Die Proben wurden vor der Gelelektrophorese bei 95 °C für 10 min. denaturiert. Die Auftrennung per SDS-Gel geschah in Laufpuffer (5mM Tris, 50mM Glycin; 0,02 % (w/v) SDS). Nach der Auftrennung wurden die Proteine im Gel mittels Semi-Dry-Blot (Bio-Rad, Hercules, USA) bei 20 Volt für 40 min. auf eine PDFV-Membran (Immobilon, Millipore, Schwalbach) transferiert. Diese wurde zuvor in Methanol aktiviert. Der Transfer in der Blot-Kammer erfolgte in Transferpuffer.

Für den Antikörpernachweis wurden die Protein-beladenen PDFV-Membranen in 5 % Milchpulver in TBST (TBS, 0,05 % Tween20) für eine Stunde blockiert. Der Primärantikörper wurde in 5 % -iger Milch in TBST verdünnt (anti-Notch2 1:500 bzw. anti-Flag 1:1000) und über Nacht bei 4 °C mit den Membranen auf einem Rollbrett inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen vier Mal für 15 min. in TBST bei RT gewaschen und dann für 1 Stunde mit HRP-gekoppeltem Sekundärantikörper verdünnt in 5 % -iger Milch in TBST (1:1000) inkubiert. Im Anschluss wurde erneut vier Mal für 15 min. gewaschen. Für die Detektion der Signale wurden die Membranen in Rotilumin-Lösung (Roth) kurz inkubiert, überschüssige Lösung abgestreift und unter einem Röntgenfilm exponiert.

3.2 Histologie

3.2.1 Entwässerung und Paraffinisierung von Geweben und Hühnchen-Micromasskulturen.

Zur Herstellung von paraffinisierten Gewebeproben wurde das präparierte Gewebe unmittelbar in 4 % PFA in PBS gegeben und über Nacht bei 4 °C fixiert. Am nächsten Tag folgten zwei 10 minütige Waschschrte in PBS bei RT auf dem Schüttler. Für die Entwässerung des Gewebes wurde folgende Ethanolreihe verwendet:

Bei RT auf dem Schüttler:

2 x 30 min	70 % Ethanol
2 x 30 min	90 % Ethanol
2 x 30 min	95 % Ethanol
4 x 30 min	100 % Ethanol

Für die Überführung in Paraffin wurde das Gewebe mit Xylol versetzt um den Alkohol zu verdrängen. Dies geschah in 4 x 10 minütigen Waschschrten bei RT. Über Nacht wurde das Gewebe in einem 1:1 Gemisch aus Xylol und Paraffin bei 60 °C inkubiert und am nächsten Tag dann 2 x für 2 h in reinem Paraffin inkubiert. Im Anschluss wurden die Gewebepräparate in Einbettförmchen und frischem Paraffin eingebettet, auf 4 °C heruntergekühlt und dann aus den Einbettformen gelöst und für die Weiterverarbeitung am Mikrotom bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.2 Anfertigung von Gewebeschnitten

Die in Paraffin eingebetteten Gewebepreparate wurden mit Hilfe eines Mikrotoms in 5-7 µm Dicke geschnitten. Die Schnitte wurden über eine Wasserrutsche in ein 37 °C warmes Wasserbad befördert und von dort, nach ihrer Streckung, auf silanisierte Objektträger aufgezogen und bei 37 °C über Nacht getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte dann bei RT oder 4 °C gelagert.

Deparaffinisieren und Rehydrierung von Gewebeschnitten

Für weitere Experimente an Gewebeschnitten wurden die Paraffinschnitte wieder bewässert. Dies geschah wie folgt:

Die Schnitte wurden zuerst für 15 min bei 60 °C erhitzt und dann 2 x 15 min in Xylol gewaschen, gefolgt von zwei Waschrufen in 100 %-igen Ethanol um das Paraffin vollständig zu lösen. Über eine absteigende Ethanolreihe (je 5 min in 95 % Ethanol, 90 % Ethanol, 75 % Ethanol, 50 % Ethanol) wurden die Gewebeschnitte in aqua bidest gebracht und dann in nachfolgenden Färbungen eingesetzt.

3.2.3 Gewebefärbungen

Alcian Blau

Die Hühner-Micromass-Kulturen wurden zu gewünschtem Zeitpunkt zuerst mit PBS gewaschen und dann mit 4 % PFA (in PBS) oder Kahles Fixativ (28.9 % EtOH; 0.37 % Formaldehyd; 3.9 % Eisessig) für mindestens 15 min bei RT fixiert. Danach wurden die Kulturen einige Male mit PBS gewaschen und mit einer 1 % Alcian Blau-Lösung (Alcian Blau gelöst in 1 N HCl) über Nacht gefärbt. Am nächsten Tag wurde die Farblösung unter laufendem Leitungswasser ausgespült und nochmals 20 min in Wasser gewaschen. Im Anschluss wurden die Kulturen fotografiert.

ALP, qualitativ

Die Hühner-Micromasskulturen wurden zum gewünschten Zeitpunkt zuerst mit PBS gewaschen und für mindestens 15 min bei RT in 4 % PFA in PBS fixiert. Die fixierten Kulturen wurden im Anschluss dreimal für 20 min in PBS gewaschen und dann 30 min in CHAP-Puffer (100 mM TRIS, pH 9.5; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂) inkubiert. Durch Zugabe von NBT-BCIP (45 µl NBT; 35 µl BCIP in 10 ml CHAP-Puffer) wurde die Entwicklung des Farbniederschlags induziert und nach 15 min durch Zugabe von TE-Puffer gestoppt. Im Anschluss wurden die

Kulturen mit aqua bidest gewaschen und bis zur Dokumentation in 4 % PFA in aqua bidest versetzt mit 25 % Glutaraldehyd und 0,5 M EDTA pH 8 bei 4 °C aufbewahrt.

Safranin O / Fast Green

Gewebeschnitte wurden nach dem Rehydrieren mit Hämatoxylinlösung für 5 min gefärbt und anschließend unter laufendem Leitungswasser gespült, bis dieses klar war. Dann wurden die Schnitte für 5 min in Fast Green-Lösung (0,001 % in destilliertem Wasser gelöst) gefärbt und im Anschluss mit 1 %-iger Essigsäure für 5 min gespült. Danach wurden die Schnitte für 5 min mit 0,1 % Safranin O-Lösung in destilliertem Wasser gefärbt und dann für je 2 x 2 min in 95 % Ethanol und 100 % Ethanol entwässert. Es folgten zwei 2-minütige Waschschrte in Xylol und schließlich das Eindeckeln der Schnitte mit Entellan.

3.2.4 Immunhistologie

Titer-Bestimmung mittels Antikörperfärbung

Für die Titer-Bestimmung der in DF-1 Zellen produzierten RCASBP-Viren, wurde eine immunhistochemische Färbung durchgeführt. Hierfür wurden DF-1 Zellen in 24-well Platten ausgesät (2×10^4 pro well) und mit jeweils 1 μ l bzw. 10 μ l vier unterschiedlicher Verdünnungsstufen des Viruskonzentrats, verdünnt in chMM-Medium (siehe 3.2.6) infiziert (Verdünnungsstufen: $1:10^3$, $1:10^4$, $1:10^5$, $1:10^6$), (siehe 3.2.8). Dies ergibt in der Summe 8 Wells pro Viruskonstrukt, wobei 1 μ l aus der $1:10^3$ Verdünnung die gleiche Zahl an infizierten Zellen ergeben sollte wie 10 μ l der $1:10^4$ Verdünnung. Nach 24 h wurden die Zellen 2 x mit sterilem PBS gewaschen und im Anschluss für 15 Minuten in 4 % PFA (in PBS) fixiert. Dann wurden die Zellen 3 x in PBS gewaschen. Es folgte eine 30 minütige Inkubationszeit in MST (DMEM, 10 % FCS (Biochrom, Berlin), 0,2 % Triton X-100) bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen über Nacht in der ersten Antikörperlösung belassen. Diese bestand aus dem monoklonalem anti-RCAS Antikörper 3C2 (Logan and Tabin, 1998) 1:5 in MST verdünnt. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3x für 10 Minuten in MST gewaschen und dann für 30 Minuten bei RT mit Sekundäntikörperlösung inkubiert. Diese bestand aus 0,5 % Pferdeserum und 1:1000 verdünntem Biotin-anti-mouse IgG (beides aus dem Vectastain IgG Mouse ABC Kit, Biozol, Eching) in MST. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 10 Minuten in PBST (0,1 % Tween 20 in PBS) gewaschen und dann für 30 Minuten in frisch angesetztem 0,3 % -igem H_2O_2 in Methanol verdünnt inkubiert. Die Zellen wurden wieder dreimal für 10 Minuten in PBST gewaschen und dann für 30 Minuten mit dem Vectastain-Mix inkubiert. Dieser wurde aus 1 Tropfen Lösung A und 1 Tropfen Lösung B pro 5 ml MST angesetzt. Nach 2 x waschen in PBST folgte die Peroxidase-Reaktion mit dem Peroxidase Substrate Kit DAB SK-4100 (Vector

Labratories, Burmingham. CA, USA). Hierfür wurden aus dem Kit 1 Tropfen des Puffers mit 2 Tropfen H₂O₂ sowie 3 Tropfen DAB pro 5 ml H₂O vermischt, auf die Zellen gegeben und 15 min im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen 3 x mit PBST gewaschen und dann in PBS und 4 °C bis zur Auswertung gelagert. Zur Titer-Bestimmung wurden die immunhistochemisch angefärbten Zellen unterschiedlicher und gleicher Verdünnungsstufen ausgezählt und auf Viruspartikel / ml Viruskonzentrat umgerechnet.

Immunhistochemische Färbung mit Tyramid Signal Amplifikation (TSA)

Die in Paraffin eingebetteten Gewebeschnitte wurden wie in 3.2.2 beschrieben deparaffinisiert und gewässert. Es folgte eine Hitzebehandlung in der Mikrowelle in Zitratpuffer pH6 (Dako, Hamburg) für 1 min bei 730 Watt, 5 min RT und nochmals 1,5 min bei 730 Watt. Danach wurden die Schnitte zum Abkühlen für 30 min bei RT stehen gelassen und anschließend 3 x für 5 min bei RT in TNT-Puffer (0,1M Tris-Hcl pH 7.5; 0,15M NaCl; 0,3% Triton X-100) gewaschen. Danach wurden die Gewebeschnitte für 15 min in 0,75% H₂O₂ Methanol bei RT inkubiert um endogene Peroxidasen zu inaktivierten. Es folgte nochmals dreimaliges Waschen in TNT für je 5 min bei RT. Die Schnitte wurden auf den Objektträgern mit einem Fettstift (Dako, Hamburg) umrandet, um das Verlaufen von Blockier- und Antikörperlösung zu verhindern. Die Schnitte wurden in Feuchtkammern gelegt und für eine Stunde bei RT mit TNB-Blockierlösung (0,1M Tris-HCl pH 7.5; 0,15M NaCl, 0,5 % Blockier-Reagenz von Perkin Elmer) inkubiert. Danach wurde die Blockierlösung durch leichtes Klopfen der Objektträger auf ein Papiertuch entfernt und durch Primärantikörper verdünnt in TNB ersetzt und über Nacht bei 4 °C in Feuchtkammern belassen. Am nächsten Morgen wurden die Schnitte dreimal für 10 min in TNT gewaschen und für eine Stunde mit sekundärem Antikörper in TNB bei RT in Feuchtkammern inkubiert und danach wieder dreimal für 10 min in TNT gewaschen. Anschließend folgte eine 5 minütige Inkubation mit TSA (Perkin Elmer, 1:50 in TSA-Puffer von Perkin Elmer, Massachusetts, USA) bei RT und sofortiges Waschen in TNT. Die Antikörperdetektion erfolgte mit Cy3 konjugiertem Extravidin (1:1000 verdünnt in TNB) und DAPI zum Anfärben der Zellkerne (1:750 in TNB). Dann wurden die Schnitte ein letztes Mal für 10 min in TNT gewaschen und in Fluoromount (Southern Biotech, USA) eingedeckelt.

3.2.5 *In situ* Hybridisierung

Templates zur Sondentranskription

Die Plasmide mit den cDNA-Sequenzen der *COL1A1*-, *COL2A1*- und *RUNX2*- Sonden aus Hühner-CDNA wurden durch Dr. Sigmar Stricker erhalten.

Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Für die Synthese von Digoxigenin-UTP (DIG-UTP) markierten RNA-Sonden wurde das DIG-RNA-Labeling Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für die *in vitro* Transkription wurden 200-300 ng gereinigtes PCR-Produkt jeweils mit der entsprechenden RNA-Polymerase (Sp6, T7, T3) transkribiert, um eine antisinn-RNA-Sonde herzustellen. Nach der Transkription folgte ein Verdau mit DNase, gefolgt von einer Ethanolfällung. Die gefällte RNA wurde in 100 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

In situ Hybridisierung auf Paraffinschnitten

Die Schnitte wurden zuerst für 1 h auf einer 60 °C vorgewärmten Heizplatte erhitzt und dann 2x in UltraClear oder Xylol für 15 min bei RT gewaschen, um das Paraffin vollständig zu lösen.

Die Rehydrierung erfolgte über eine absteigende Ethanolreihe in folgenden Schritten und Lösungen:

2x 10 min 100% EtOH

5 min 75% EtOH / DEPC-H₂O

5 min 50% EtOH / DEPC-PBS

5 min 25% EtOH / DEPC-PBS

2x 5 min DEPC-PBS

Gewebevorbereitung für die Hybridisierung mit RNA-Sonden

Die Schnitte wurden für 10 min in 4% PFA (in PBS) fixiert und danach dreimal für 5 min in DEPC-PBST (DEPC-PBS mit 0,1 % Tween 20) gewaschen. Es folgte ein Verdau mit Proteinase K in DEPC-PBS (je nach Art der Gewebeschnitte unterschiedlich konzentriert und lang) und dreimaliges Waschen in DEPC-PBST für 5 min bei RT. Die Schnitte wurden dann nochmals für 5 min in 4% PFA/PBS nachfixiert und erneut dreimal für 5 min mit DEPC-PBST gewaschen.

Es folgte eine 10 minütige Acetylierung zur Verringerung des Hintergrunds mit 500 µl Essigsäure-Anhydrid in 200 ml 0,1 M Triethanolamin (TEA) gefolgt von dreimaligem Waschen in DEPC-PBST.

Für die Prähybridisierung wurden die Schnitte in einer feuchten Kammer bei 65 °C für 1–4 Stunden inkubiert. Dafür wurden 150–200 µl Hybridisierungsmix (10 mM Tris pH 7,5; 600 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,25 % SDS; 10 % Dextran Sulfat; 1× Denhardt's; 200 µg/ml, Hefe tRNA; 50 % Formamid) pro Objektträger eingesetzt und die Schnitte mit Folie abgedeckt. Zur Hybridisierung mit Sondenmaterial wurden 1 – 2 µl der jeweiligen RNA-Sonde in 100 µl Hybridisierungsmix gegeben, für 5 min bei 85 °C denaturiert und im Anschluss auf die Objektträger gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 65 °C und in

Feuchtkammern. Am nächsten Tag wurden die Schnitte in 5 x SSC gespült, für 30 min bei 65 °C in 1 x SSC/50 % Formamid inkubiert und im Anschluß für 10 min in RNase Puffer (10 mM Tris pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8,0 und 400 mM NaCl) bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Verdau mit RNase (20 µg/ml, Sigma) für 30 Minuten bei 37 °C in RNase Puffer gefolgt von einem zehnminütigen Waschschrift in RNase Puffer bei 37 °C. Nach einer absteigenden Reihe von Waschschriften in SSC (20 min 2 x SSC, 2 x 20 Minuten 0,2 x SSC) bei 65 °C und einem Waschschrift in MABT (100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5 mit NaOH eingestellt; 0,05 % Tween-20) bei RT, wurden die Gewebe für mindestens zwei Stunden mit 20 % Sheep HI Serum in MABT blockiert. Während dieser Zeit erfolgte eine Präabsorbition des Antikörpers (α DIG-AP Fab Fragmente, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim), 1:2500 verdünnt in 5 % Schaf HI Serum in MABT für 2 Stunden bei 4 °C. Vor Gebrauch wurde 0,05 % Tween-20 zur Antikörperlösung hinzugegeben, 200 - 300 µl Antikörperlösung auf die Objektträger pipettiert und diese wieder mit Folie abgedeckt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4° C über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Objektträger in MABT-Puffer getaucht, die Folien entfernt und drei weitere Male für 5 min in MABT gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten in ALP-Puffer (100 mM NaCl; 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 50 mM MgCl₂; 0,05 % Tween-20) überführt. Die Detektion des Signals erfolgte bei RT mit je 35 µl NBT und BCIP pro 100 ml ALP-Puffer. Zur Farbentwicklung wurden die Schnitte lichtgeschützt auf einem Schüttler bei RT inkubiert. Bei gewünschter Signalintensität wurde die Reaktion durch Waschen in ALP-Puffer abgestoppt. Es folgte zweimaliges Waschen in PBS für 5 min bei RT und eine 30 minütige Nachfixierung in 4 % PFA in PBS. Anschließend wurden die Schnitte in Hydromatrix (Micro-Tech-Lab) eingedeckelt.Zellkultur

3.2.6 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

DF1 Zellen

DF1 Zellen wurden zur Produktion von RCAS-Viren verwendet. Eine Kultivierung erfolgte in DMEM (Lonza, Basel, Schweiz) mit 4,5 g/l Glukose mit 10 % FBS (Biochrom, Berlin) 2 % Hühnerserum (Gibco Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert.

CV1 Zellen

CV1 Zellen wurden für Luciferase-Reporterexperimente (3.2.10) verwendet und in DMEM mit 1 g/l Glukose (Lonza, Basel, Schweiz) mit 10 % FBS (Biochrom, Berlin) in Gegenwart von 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg pro ml Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

Hühner-Micromasskulturen

Hühner-Micromasskulturen (siehe Absatz 3.2.7) wurden in chMM-Medium (DMEM:HAM'S F-12 1:1 (Biochrom, Berlin), 10 % FCS (Biochrom), 0,2 % Chicken Serum (Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert kultiviert.

3.2.7 Hühnchen Micromasskulturen (chMM)

Primäre Zellen von Extremitätenknospen wurden für die Hühnchen Micromass-Kultur wie unter Lehmann et al., 2003 beschrieben gewonnen.

Die Extremitätenknospen von 20–40 Hühnerembryonen (Hamburger-Hamilton Stadium 22–24) wurden in PBS (Lonza, Verviers, Belgien) abgetrennt und einige Male mit auf 37 °C vorgewärmten HBSS (Biochrom, Berlin) gewaschen. Zur Entfernung des Ektoderms wurden die Extremitätenknospen für 15-30 min mit Dispase-Lösung (3 mg/ml in HBSS) bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde mehrmals mit warmen HBSS gespült. Dafür wurde wiederholt HBSS auf die Extremitätenknospen pipettiert und gleich wieder abgezogen, um die ektodermalen Häutchen vollständig aus dem Gefäß zu entfernen.

Durch einen 30 minütigen Verdau in 1 ml Kollagenase-Lösung (0,1 % Kollagenase Typ Ia (Sigma-Aldrich), 0,1 % Trypsin (Gibco), 5 % FBS (Biochrom, Berlin) in PBS) wurden die Zellen vereinzelt. Zum Abstoppen der Reaktion wurden die Zellen in 10 ml Medium (DMEM:HAM'S F-12 1:1 (Biochrom, Berlin), 10 % FCS (Biochrom), 0,2 % Chicken Serum (Gibco, Invitrogen GmbH, Karlsruhe), 4 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Biochrom, Berlin) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde dann mit einem Zellsieb (45 µm, BD Bioscience) gefiltert um die Zellen vollständig zu vereinzeln. Der Filter wurde dann nochmal mit 20 ml Medium gespült. Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf eine Konzentration von 2×10^7 Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl (entsprechend 2×10^5 in einem Tröpfchen pro Well einer 24-Well-Platte ausgesät. Zur Adhäsion der Zellen wurden die Platten 2 Stunden lang bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert und dann zu jedem well 1 ml Medium gegeben. Die Kulturen wurden über die benötigten Zeiträume bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert und das Medium wurde alle 2 - 3 Tage erneuert.

Für die Infektion mit RCASBP-Viruspartikeln wurden die Zellen vor der Aussaat in benötigte Mengen aliquotiert und mit entsprechendem Virus in vergleichbaren Konzentrationen infiziert.

3.2.8 Transfektionen

Transfektion von DF1 Zellen für Virusproduktion und Viruspräparation

DF1 Zellen wurden während dieser Arbeit ausschließlich mit RCASBP Midi-Plasmid-Präparationen (Absatz 3.1.1) transfiziert, um Viren für die Infektion von primären Hühnerzellen zu produzieren.

Für die Transfektion wurden DF1 Zellen zunächst in Schalen von 10 cm Durchmesser ausgesät und nach 24 h transfiziert. Dafür wurden 7 µg RCASBP-Plasmid mit 200 µl 150 mM NaCl vermischt und 18 µl Exgen500 (Fermentas, St.Leon-Roth) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz wurden die DF1 Zellen mit nur 3 ml Medium bedeckt und dann das Transfektionsreagenz-DNA-Gemisch zugegeben. Nach 5 h wurde das Medium auf 10 ml Volumen aufgefüllt. Bei 100 %-iger Konfluenz der Zellen wurden eine Schale (10 cm Durchmesser) auf drei Schalen von 15 cm Durchmesser gesplittet und wieder bis zu 100 % Konfluenz wachsen gelassen. Dann wurde jede Schale nochmals 1:2 gesplittet, so dass für jede Transfektionsansatz am Ende 6 15 cm Schalen vorhanden waren. Diese wurden wieder kultiviert, bis die DF1 Zellen 100 % konfluent waren. Das Standardmedium wurde dann durch Mangelmedium ersetzt (wie Standardmedium, aber mit nur 1 % FBS und 0,2 % Hühnerserum). Das Mangelmedium wurde dann an drei aufeinander folgenden Tagen gesammelt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei – 80 °C gelagert. Für die Aufkonzentrierung der im gesammelten Mangelmedium enthaltenen Viruspartikel wurde dieses bei 37 °C aufgetaut, filtriert, (Stericup 0,45 µm HV Durapore + Fiberglass Prefilter (Millipore, Schwalbach) und sofort auf Eis gehalten. Das Medium wurde in einer Ultrazentrifuge für 3 Stunden bei 4 °C und 22000 RPM (SW 32 Ti Ausschwingrotor, Beckman-Coulter) in Portionen zu jeweils 32 ml pro Röhrchen zentrifugiert. Die Überstände wurden bis auf wenige 100 µl verworfen und die Viruspellets durch 1-stündiges Schütteln mit dem Restüberstand bei 4 °C und anschließendes Mischen mit einer Pipette resuspendiert. Aliquots von 25 µl wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Transfektion von CV1 Zellen für Luciferase-Assays

CV1 Zellen wurde für Luciferase-Reporterexperimente verwendet und mit Polyfect (Qiagen, Hilden) transfiziert. Dafür wurden CV1 Zellen in einer Zelldichte von 6×10^4 Zellen pro ml eingestellt und dann je 500 µl dieser Zellsuspension pro Well einer 24-well-Platte ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen bei einer Konfluenz von ca. 70 % transfiziert. Ein dreifacher Transfektionsansatz bestand aus 1500 ng Plasmid-DNA Gemisch (siehe 3.2.10) und 7 µl Polyfect. Das Volumen wurde auf 66 µl mit DMEM (Lonza, Basel, Schweiz) ohne Serum

und Antibiotika aufgefüllt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden je 22 µl des Ansatzes zu einem Well einer 24-Well-Platte gegeben, um die Zellen zu transfizieren.

3.2.9 Immunzytologie

Die Zellen für immunzytologische Untersuchungen wurden auf Glasplättchen ausgesät, die auf den Boden der Wells einer 6-Well-Platte gelegt wurden. Zum gewünschten Zeitpunkt wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 10 Minuten bei 4°C in 3,7% Formaldehyd (in PBS) fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal für 5 Minuten bei RT mit PBS gewaschen und dann 10 Minuten bei RT mit 0,4% Triton x-100 (in PBS) permeabilisiert. Dann wurde für 30 Minuten in Blockierlösung (3 % BSA, 0,2 % Triton-x-100, in PBS) inkubiert. Für die Behandlung mit dem Primärantikörper (Tabelle 2.5), wurde dieser in entsprechender Verdünnung in Blockierlösung verdünnt und dann 50µl auf Parafilm in einer Feuchtkammer pipettiert. Auf diesen Tropfen wurden die Glasplättchen mit den fixierten Zellen gelegt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen wieder dreimal für 5 Minuten in PBS gewaschen um sie dann mit dem Sekundärantikörper (Tabelle 2.5), verdünnt in Blockierlösung zu inkubieren. Dies geschah wie bei der Inkubation des ersten Antikörpers auf Parafilm in einer Feuchtkammer für 1 h bei RT. Anschließend wurden die Zellen wieder 3 x 5 Minuten bei RT gewaschen und mit Fluoromount-G (Southern Biotech, USA) auf Objektträger fixiert.

3.2.10 Luciferase-Reporter-Assays

Für die Luciferase-Reporter-Experimente wurden CV-Zellen verwendet und mit den unten aufgeführten Konstrukten transfiziert (Transfektionen von CV1-Zellen siehe Absatz 3.2.8). Für die Normalisierung der Luciferase-Aktivität in einem jedem Experiment enthielten die Transfektionsansätze neben den Plasmiden für Reporter- und Treiberkonstrukte auch das pRL-CMV-Plasmid. Dieses exprimiert die Renilla-Luciferase unter einem CMV-Promotor.

Verwendete Luciferase-Reporterkonstrukte

Alle hier verwendeten Reporterkonstrukte wurden mittels Verwendung spezifischer Primer aus genomischer DNA (Absatz 3.1.1) amplifiziert und in die Vektoren pGL4.10 oder pGL4.23 kloniert. Dafür wurden spezifische Primer mit Überhängen synthetisiert, die eine Restriktionsschnittstelle enthielten und über einen entsprechenden Verdau in die Vektoren kloniert werden konnten.

Tabelle 3.1 Genomische Loci der klonierten Promotorkonstrukte.

Name des klonierten Konstruktes	Genomische Lokalisation des Konstruktes (galGal3)	Zielvektor [kloniert über]
<i>Notch2</i> -Promotor	chr8: 4183883 - 4186660	pGL4.10 [XhoI]
Hey1-Enhancer	chr2: 125477219 - 125478327	pGL4.23 [XhoI]
Wnt5a-Enhancer	chr12: 8142263 - 8143898	pGL4.23 [XhoI, EcoRV]
CDH2-Promoter	chr2: 108063352 - 108065310	pGL4.10 [XhoI, EcoRV]

Verwendete Luciferase-Treiberkonstrukte

Die zu untersuchenden Transkriptionsfaktoren wurden aus cDNA (Absatz 3.1.3) amplifiziert, wobei die 5'-Primer die Kozaksequenz gccacc enthielten, um die Translation zu optimieren. Primer enthielten zudem spezifische Schnittstellen. Die so synthetisierte Sequenz wurde mit entsprechenden Enzymen verdaut und in den Expressionsvektor pVAX1 kloniert.

Mit Flag-Epitop versehene Sequenzen von Transkriptionsfaktoren wurden aus dem RCASBP-Vektor über einen *Clal* / *SpeI*-Verdau herausgeschnitten und ebenfalls in einen modifizierten pVAX1 kloniert, in den eine *SpeI* - Erkennungssequenz integriert wurde.

Bestimmung der Luciferase-Aktivität in CV-1 Zellen

Für alle Luciferase-Assays wurde das Dual-Glo-Kit (Promega, Mannheim) verwendet. Dafür wurden die Zellen 24 h nach Transfektion (siehe 3.2.8) durch die Zugabe von 100 µl „Passive Lysis Buffer“ (Promega, Mannheim) pro 24-Well für 10 Minuten bei RT lysiert. Von jedem Reaktionsansatz wurden 10 µl Lysat mit 25 µl Dual-Glo-Reagenz vermischt und 10 Minuten im Dunkeln inkubiert. Dann wurde die Lumineszenz der Firefly-Luciferase in einem Luminometer (MicroBeta TriLux 1450) gemessen. Anschließend wurde sofort 25 µl Stop-and-Glo-Reagenz zu jedem Reaktionsansatz gegeben, welches das Substrat für die Renilla-Luciferase enthält. Das Lysat-Substratgemisch wurde ebenfalls für 10 Minuten im Dunkeln inkubiert und die Lumineszenz erneut im Luminometer gemessen. Für die Normalisierung der Firefly-Aktivität wurden die Firefly-Messwerte durch die Renilla-Messwerte dividiert. Mittelwerte und Standardabweichung wurde immer aus drei Replikaten ermittelt.

3.3 Chromatin Immunpräzipitation

Für die Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) wurde Chromatin aus Hühner-Micromass-Kulturen 9 Tage nach RCASBP Infektion gewonnen.

Die Kulturen wurden zum gewünschten Zeitpunkt in 200 – 400 µl Kollagenaselösung (0,1% (w/v) Kollagenase Typ Ia von Sigma in chMM-Medium (siehe 3.2.6) für 45 – 60 Minuten bei 37 °C inkubiert und durch zusätzliches auf und ab pipettieren vereinzelt. Die Kulturen eines zusammengehörigen Ansatzes wurden zusammengeführt und bei 173 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml eiskaltem chMM-Medium resuspendiert. Ab dann wurden die Proben auf Eis gehalten. Um das Chromatin zu fixieren, wurden 273 µl 37 % Formaldehyd zugegeben (Endkonzentration 1 % Formaldehyd) und für 10 Minuten bei 4°C auf einem Rollenmischer gedreht. Durch Zugabe von 550 µl 2,5 M Glycin in PBS wurde die Reaktion abgestoppt und die fixierten Zellen erneut bei 4 °C und 173 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde entsorgt und das Zellpellet in PBS aufgenommen. Hierfür wurde das Pellet zuerst in 1 ml PBS vorsichtig gelöst und dann auf 10 ml aufgefüllt. Die Proben wurden erneut abzentrifugiert (5 Minuten, 173 g, RT) wie zuvor in 10 ml PBS resuspendiert, in frische Gefäße überführt und hierbei je nach Menge des Materials auch in mehrere Aliquots aufgeteilt. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert (5 Minuten, 173 g, RT), der Überstand verworfen, die Zellpellets in flüssigen Stickstoff schockgefroren und danach bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Für die eigentliche Chromatin Immunpräzipitation wurden die fixierten Zellpellets in 10 ml Resuspensionspuffer (50mM HEPES-KOH, pH 7.5, 140mM NaCl, 1mM EDTA, 10% Glycerin, 0,5% NP-40, 0,25% Triton X-100, Protease Inhibitoren: Roche complete mini Tabletten) resuspendiert und für 10 min bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Die Zellen wurden anschließend bei 4 °C und 1350 g für 5 Minuten pelletiert, der Überstand abgenommen und anschließend in 10 ml Zellysepuffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 200mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, Protease Inhibitoren: Roche Tabletten) gelöst. Die Proben wurden erneut für 10 Minuten auf einem Rollenmischer bei RT inkubiert und wieder abzentrifugiert (1350 g, 5 Minuten, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1,5 ml Zellkernlysepuffer (10mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 0.5mM EGTA, 0,1% Na-Deoxycholat, 0,5% *N*-Lauroylsarcosine, Protease Inhibitoren: Roche complete mini Tabletten) resuspendiert. Die Proben wurden von nun auf Eis gehalten. Um das Chromatin für die Immunpräzipitation in gleich große Fragmente zu scheren, wurde das Chromatin in einem Bioruptor sonifiziert. Dafür wurden die 1,5 ml Proben in 15 ml Falcon-Röhrchen (BD Falcon) überführt und in 45 Zyklen sonifiziert. Jeder Zyklus bestand aus 30 Sekunden Puls (hohe Stufe), gefolgt von 30 Sekunden Pause. Nach dem Sonifizieren wurden die Proben in 2 ml Reaktionsgefäße überführt und 150 µl (0,1 Volumen) 10 % Triton X-100 (in Nuklease-freiem Wasser gelöst) zugefügt. Um den Zelldebris zu entfernen wurden die Proben für 10 Minuten bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert und der Überstand mit dem gescherten Chromatin in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Für die Bestimmung der Konzentration und der Qualität der Fragmentierung wurden 100 – 200 µl der jeweiligen Proben entnommen, das restliche

Probenmaterial in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Von den 100 – 200 µl Testproben wurde nun für die qualitative und quantitative Kontrolle genomische DNA isoliert. Dafür wurde zuerst die Quervernetzung der DNA-Proteinkomplexe aufgelöst. Dies geschah durch Zugabe von einem Zehntel Volumen 5 M NaCl und Inkubation für 15 Minuten bei 99 °C oder über Nacht bei 65 °C. Anschließend wurden die Testproben für 30 Minuten bei 37 °C mit RNase A (10mg/ml) verdaut, dann für ebenfalls 30 Minuten bei 55 °C mit Proteinase K (20mg/ml) behandelt und schließlich mit Glycogen und 2,5 x Vol. 100 % igem Ethanol gefällt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert und die pelletierte DNA mit 70 %-igem Ethanol gewaschen. Die Proben wurden erneut bei 16000 g und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert und in 20 µl bidest gelöst. 1 µl dieser Probe wurde für eine Konzentrationsbestimmung am Nanodrop verwendet, und der Rest auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen um die Fragmentgröße der gescherten DNA zu überprüfen.

Bei gewünschter Qualität und Quantität wurden die Proben für die Immunpräzipitation verwendet. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Für die Präzipitation der Protein-DNA-Komplexe wurden zuerst Protein G-Dynabeads (Life Technologies, Darmstadt) mit Antikörper beladen. Für eine ChIP wurden 40 - 50 µl Dynabeads eingesetzt. Diese wurden in Blockierlösung (steriles PBS + 0,25% BSA) aufgenommen und zwei weitere Male in dieser Lösung gewaschen. Um die Dynabeads während aller Waschvorgänge nicht zu verlieren, wurde stets ein Magnetständer verwendet, mit dem die Dynabeads gefangen wurden und die Lösungen ausgetauscht werden konnte. Nach dem Waschen in Blockierlösung wurden die Dynabeads in 100 – 200 µl Blockierlösung behalten, die benötigte Menge Antikörper hinzugegeben (Tabelle 3.2) und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Anschließend wurde je ChIP 30 – 40 µg sonifiziertes Chromatin in Kernlysepuffer hinzugegeben und erneut über Nacht bei 4 °C auf einem Rollenmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die gekoppelten Dynabeads am Magneten gesammelt und der Überstand entfernt. Die Dynabeads-Antikörper-Chromatin-Komplexe wurden nun 7-mal mit RIPA Puffer (50mM HEPES-KOH, pKa 7.55, 500mM LiCl, 1mM EDTA, 1,0% NP-40, 0,7% Na-Deoxycholat, Protease Inhibitoren: Roche complete mini Tabletten) gewaschen. Dabei wurde stets darauf geachtet, dass sich beim Resuspendieren das Dynabead-Pellet vollständig von der Gefäßwand löste, um gründlich in RIPA gespült zu werden. Dann wurden die Dynabeads in 1 ml TE (10mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA, Protease Inhibitoren: Roche complete mini Tabletten) aufgenommen, die Dynabeads wieder am Magneten gesammelt, der Überstand verworfen, dann die Dynabeads bei 960 g für 3 Minuten und 4 °C zentrifugiert und anschließend der Rest TE-Puffer vollständig abgenommen und verworfen. Die Dynabeads-Chromatin-Komplexe wurden dann in 210 µl Elutionspuffer (50 mM Tris-HC pH8.0, 10mM EDTA, 1.0% SDS) aufgenommen und für 30 Minuten bei 65 °C und 1300 rpm auf einem Thermomixer geschüttelt, um das präzipitierte Chromatin von den Dynabeads zu lösen. Die Dynabeads wurden

anschließend durch einminütiges Zentrifugieren bei 16000 g und 4 °C pelletiert, um 200 µl des Überstands mit dem Chromatin in ein frisches Reaktionsgefäß zu überführen. Das im Eluat enthaltene Chromatin wurde zur Aufreinigung der DNA weiterbehandelt. Dafür wurde 0,5 M NaCl zugegeben und über Nacht bei 65 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 4 µl RNaseA (10mg/ml in bidest) zugegeben und für 30 Minuten bei 37°C belassen. Anschließend wurde das Eluat mit 4 µl Proteinase K (20mg/ml in DEPC-H₂O) für 30 Minuten bei 55 °C inkubiert und mit Ethanol gefällt. Dafür wurden 4 µl Glykogen (Fermentas) zugegeben, gut gemischt, dann mit dem 2,5-fachen Volumen an reinem Ethanol aufgefüllt und für 1 Stunde bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen und nochmals für 10 Minuten bei 4 °C und 16000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Pellet kurz getrocknet und dann in 46 µl bidest gelöst. 1 µl der Probe wurde erneut zur Messung der DNA-Konzentration mit dem Nanodrop verwendet. Die Probe wurde dann nach weiterer Qualitätsbestimmung für die Sequenzierung (Absatz 3.4) verwendet.

Tabelle 3.2 Verwendete Antikörper (pro 40 µl Dynabeads und Chromatinmengen)

Antikörper (siehe auch Tabelle 2.1)	Volumen	Menge Chromatin
anti-trimethyl-Histon H3 (Lys4)	10 µl	15 – 20 µg
anti-Flag M2, mouse	10 µl (10µg)	30 – 40 µg

3.4 Next Generation Sequencing (NGS)

Die für das *next generation sequencing* (NGS) bereitgestellte DNA (Absatz 3.3) wurde in der NGS-Core Unit des Berlin-Brandenburger Centrums für Regenerative Therapien sequenziert. Zur Präparation der Libraries wurde der NEB Next ChIP-seq Library Prep Master Mix (New England Biolabs, Frankfurt a.M.) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina Genome Analyzer IIx (Illumina, CA, USA) mit einer Leseweite von 36 Basen oder auf einem Illumina HiSeq1500 mit einer Leseweite von 50 bp. Die erhaltenen Sequenzdaten, wurden im fastq-Format durch Peter Hansen aus der Bioinformatik-Arbeitsgruppe des Instituts für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité zur weiteren Analyse bereitgestellt.

3.5 Bioinformatische Aufbereitung der Sequenzdaten

3.5.1 Primäre Analyse der CHIP-seq Sequenzdaten

Nach einer ersten Qualitätskontrolle der durch NGS generierten Sequenzen mit dem Programm „FastQC“ (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) wurden alle sequenzierten *Reads* unter der Verwendung des „FastQ Quality Filters“ (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) mit einem Phred-Qualitäts-Wert von < 28 verworfen. Dieser gefilterte Datensatz wurde erneut mit dem Programm „FastQC“ analysiert und die Qualitätsmerkmale erneut überprüft.

„Read-Mapping“ und Erstellung der nicht-redundanten Sequenzdaten

Die gefilterten *Reads* wurden auf das Referenzgenom WUGSC 2.1/galGal3 (Mai 2006) des „Genom Sequencing Centers der Washington University School of Medicine“ in St. Louis, MO, USA (WUSTL) kartiert (*gemappt*). Dies geschah unter der Verwendung des „Burrows-Wheeler Aligners“ (BWA) – Programms (Li and Durbin, 2009). Beim Kartieren der *Reads* auf das Referenzgenom wurden zwei Basen-Fehlpaarungen zugelassen.

Von allen auf dem Referenzgenom kartierten *Reads* wurden solche Sequenzen entfernt, die an mehreren Loci im Genom gemappt wurden, also deren zugehörige Sequenz im Genom nicht einmalig war. Im nächsten Schritt wurden alle Kopien von mehrmals vorhandenen *Reads* verworfen, so dass jeder *Read* nur einmal im Datensatz existiert und nur einmal im Genom abgebildet wird (nicht-redundante *Reads*). Die nicht-redundanten Reads eines Experiments sollten die Anzahl von 10 Millionen nicht unterschreiten.

Cross-Correlation-Analyse

Die nicht-redundanten Sequenzen wurden einer *cross-correlation*-Analyse (Kharchenko et al., 2008) unterzogen, um den normalisierten Strang-Koeffizienten (NSC) und den relativen Strang-Koeffizienten (RSC) zu ermitteln. Dieser ist ein Maß für das Verhältnis von Signal zu Rauschen. Für die weiterführende Analyse wurden die vom ENCODE Konsortium festgelegten Grenzwerte von einem NSC $> 1,05$ und einem RSC von $> 0,8$ genutzt (Landt SG et al. 2012). Zudem ermittelt die *cross-correlation*-Analyse eine durchschnittliche Fragment-Länge. Diese wurde für die Berechnung der *Peaks* verwendet (Absatz 3.5.2).

3.5.2 Weiterführende Analysen der ChIP-seq – Daten

ChIP-seq Datensätze, die nach der primären Datenanalyse, die festgelegten Maßstäbe für das Read-Mapping und die Cross-Correlation-Analyse (3.5.1) erfüllt wurde für weiterführende Analysen verwendet.

Peak Calling-Algorithmus

Für das Erstellen der *Peak*-Listen aus den nicht-redundanten Sequenzdaten wurde der *Peak calling* -Algorithmus von MACS2 (Zhang et al., 2008) verwendet. Für die Ermittlung der *Peaks* wurden entweder die einzelnen ChIP-seq Replikate mit der Kontrolle, also dem dazugehörigen Input (Sequenziertes Chromatin aus dem gleichen Experiment vor der Chromatin-Immunpräzipitation) verwendet oder zwei Datensätze von zwei vereinten Replikate mit zwei vereinten dazugehörigen Inputs. Außer den *Peaks* wird von MACS2 auch der *Summit* eines jeden *Peaks* bestimmt. Das ist eine 1 bp – Position innerhalb eines *Peaks*, an dem sich die höchste *Read*-Anreicherung messen lässt und in dessen Nähe sich wahrscheinlich die genaue Bindungsstelle des Transkriptionsfaktors an die DNA befindet.

MACS2 wurde mit den in Tabelle 3.3 aufgeführten Einstellungen verwendet.

Tabelle 3.3 Auflistung der Parameter-Auswahl für den Peak-Caller MACS2

ChIP File	nicht-redundante <i>Reads</i>
Control File	Input
Select a format	BAM
Effective genome size	1.0e9
Tag size	36 bp bzw. 50 bp
Band width	Fragment-Länge (siehe <i>cross-correlation</i> - Analyse)
q-value cutoff for peak detection	None
p-value cutoff for peak detection	1e-1
Select the regions with MFOLD high-confidence enrichment ratio against background to build model	10,30
Use fixed background lambda as local lambda for every peak region	False
The small nearby region in basepairs to calculate dynamic lambda. This is used to capture the bias near the peak summit region.	1000
The large nearby region in basepairs to calculate dynamic lambda. This is used to capture the surround bias	10000
Terminate MACS2 if paired-peak model fails.	False
Bypass building the shifting model.	False
Shift size	100
Keep duplicates	auto
Composite broad regions in BED12	False

Cutoff for broad region	0.1
Linearly scale the smaller dataset to the same depth as larger dataset	True
Scale down the bigger sample	False
Extend tags by the half of d (experimental)	False

IDR – Analyse zur Definition von „potentiell gebundenen Regionen“ aus ChIP-seq Daten

Um unter den Sequenzdaten der ChIP-seq Experimente echte Signale (tatsächliche DNA-Transkriptionsfaktorbindung) von Rauschen (falsches Signal, das nicht auf DNA-Transkriptionsfaktorbindungen beruht) zu unterscheiden, wurden mithilfe der „Irreproducible discovery rate“ (IDR) alle *Peaks* oberhalb einer $IDR = 0,01$ als echte Signale definiert. Die *irreproducible discovery rate* (IDR) (Li et al., 2011) misst die Konsistenz zwischen zwei ChIP-seq Replikaten und beschreibt, wie reproduzierbar diese sind.

Es wird die Annahme gemacht, dass tatsächliche Signale (beruhend auf einer tatsächlichen Transkriptionsfaktor-DNA Bindung) eine höhere Intensität haben, als das Hintergrundrauschen. In einer nach Signifikanzen sortierten Rangliste von detektierten Signalen wird daher davon ausgegangen, dass die stärkeren Signale wahre Signale sind. Die zweite Annahme besteht darin, dass – unterliegen zwei Replikate der gleichen Biologie – die relativen Signalintensitäten von wahren Signalen reproduzierbar sind und somit an einer ähnlichen Position in einer Rangliste stehen. Dies gilt höchst wahrscheinlich nicht für falschpositive Signale. Dadurch lässt sich der Übergang von Signal (reproduzierbar) und Rauschen (nicht reproduzierbar) messen, wenn man die Änderung der Konsistenz von Signalen zweier Ranglisten gegen die steigende Konsistenz aufträgt.

Motivanalyse

3.5.2.1.1 De novo Motivanalyse

Für die Ermittlung überrepräsentierter Sequenzmotive wurde das Programm DREME (Bailey, 2011) oder RSAT (Thomas-Chollier et al., 2008) verwendet.

Die Sequenzdaten für die Analyse wurden wie folgt erstellt:

Für alle *Summits* (Basenpaarkoordinate mit höchster *Read*-Anreicherung in einem Peak) oberhalb einer IDR von 0,01 wurde ein Sequenzradius von 75 bp stromauf- und stromabwärts berechnet. Diese 150 bp langen Sequenzen wurden dann für die Motivanalyse mit DREME oder RSAT verwendet. Für DREME wurde ein E-Wert von $<0,5$ festgelegt.

3.5.2.1.2 Motivanalysen mit CentriMo

CentriMo (*Central Motif Enrichment Analysis*) sucht nach bekannte Motive, mit gehäufte Anreicherung im Zentrum einer gegebenen Sequenz (Bailey and Machanick, 2012). Dafür greift CentriMo auf verfügbare Motive verschiedener Datenbanken zu. Alternativ verwendet CentriMo auch Motive, die von DREME identifiziert wurden. Dafür wird das von DREME erhaltene xml-Dateiformat in CentriMo hochgeladen. Das Programm steht zur freien Verfügung und ist unter dem Link <http://meme.nbcrl.net/meme/cgi-bin/centrimo.cgi> zu finden.

3.5.2.1.3 Motivanalysen mit TOMTOM

TOMTOM (*Motif comparison Tool*) berechnet die Ähnlichkeit eines Motivs zu bekannten Motiven, die in verschiedenen Datenbanken verfügbar sind (Gupta et al., 2007) und steht unter der Seite <http://meme.nbcrl.net/meme/cgi-bin/tomtom.cgi> zur freien Verfügung.

Genomweite Verteilung potentiell gebundener Regionen aus ChIP-seq Experimenten

Für eine Beurteilung der genomweiten Verteilung von potentiell gebundenen Regionen oberhalb einer IDR von 0,01 (siehe auch 3.5.2 unter IDR-Analyse) wurde das Referenzgenom WUGSC 2.1/galGal3 in die Klassen *intergenisch*, *Gen-flankierend*, *Promotor*, *Exon* und *Intron* geteilt (Tabelle 3.4) und die Anzahl der *Peaks* je Klasse gezählt. Die benötigten Daten hierfür wurden bei Biomart (<http://www.ensembl.org/biomart/martview>) heruntergeladen.

Zudem wurden die Klassen in konservierte und nicht konservierte Sequenzen geteilt. Hierfür wurde der von UCSC-Genom-Browser erhältliche Datensatz „phastCons7“ verwendet (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTables?hgsid=329174043> mit dem Pfad „Comparative Genomics → Conservation → phastCons7way“).

Die Kriterien für die Klasseneinteilung sind in Tabelle 3.4 aufgeführt.

Tabelle 3.4 Klasseneinteilung des *Gallus gallus* Genoms.

Genomische Klasse	Spanne der Sequenz
A) Exon	Biomart Annotierung
B) Intron	Biomart Annotierung
C) Promotor	9 kb gesamt Abbildung 3.1 um die TSS eines jeden in Ensemble annotiertes Gen
D) Gen-flankierende	10 kb Sequenz vor bzw. nach einem Gen
E) Intergenisch	Verbleibende genomische Sequenz, die nicht in eine der Klassen A-D fällt.

Identifikation von Zielgenen

Für die Ermittlung gebundener Zielgene wurden die Genomdaten aller kodierenden Gene mit Hilfe von „Biomart“

(<http://www.ensembl.org/biomart/martview/1ee19fa25bc4ebabe8036b474b37283f>)

heruntergeladen. Die Listen dieser Referenzgene des Ensembl-Genom-Browsers bestanden aus der genauen Anfangs- und Endposition des kodierenden Gens, sowie der zugehörigen Ensembl Gen-Identifikationsnummer (ENSGAL Gen-ID) und dem zugehörigen Gennamen.

Mittels dieser Referenz-Sequenzen der 19735 in Ensemble dokumentierten kodierenden Gene wurden die dazugehörigen Promotoren von insgesamt 9000 bp definiert (Abbildung 3.1) und mit den gebundenen Regionen der Flag-RUNX2 und Flag-MSX2 ChIP-seq Daten verglichen. Dafür wurden alle Peaks oberhalb einer IDR von 0,01 auf den erstellten Promotorsequenzen abgebildet.

Eine Überlappung von mindestens 1 bp zwischen *Peak* und Promotorsequenz war nötig, um das der Promotorsequenz zugeordnete Gen als potentielles Zielgen zu definieren.

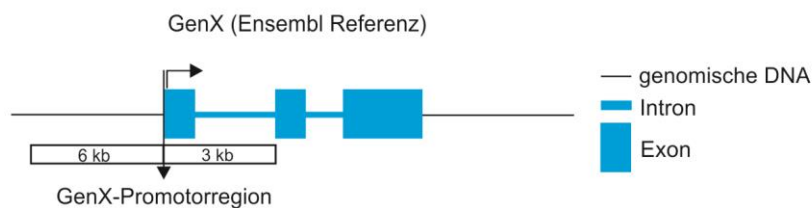


Abbildung 3.1 Schema zur Darstellung der Promotordefinition. Eine Region von 6 kb aufwärts und 3 kb abwärts eines jeden in Ensemble annotierten kodierenden Gens wurden als Promoter definiert und auf eine Überlappung mit ChIP-seq generierten Bindestellen abgeglichen.

Genontologie

Zur Analyse von Gengruppen mit bestimmten Funktionen (z.B. Transkriptionsfaktoren) wurden die potentiellen Zielgene mit ausgewählten Gengruppen verglichen, die vom „Gene Ontology (GO)“ – Konsortium (<http://www.geneontology.org/>) erstellt wurden und frei verfügbar sind. Das GO-Konsortium ordnet Genprodukte verschiedenster Organismen mit ihren Funktionen in drei Hauptkategorien „biologischer Prozess“, „molekulare Funktion“ und „Zellulärer Bestandteil“ und deren Untergruppen. Die hier ausgewählten Gengruppen sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Jede der aufgeführten GO – Gruppen enthalten die *Gallus gallus* Genannotationen, sowie deren Homologe in *Mus musculus* und *Homo sapiens*.

Tabelle 3.5 Verwendete Termini von Gen-Ontologien.

GO - Terminus	GO – Zugangsnummer (ID)
Transcription factor binding	0008134
BMP signaling pathway	0030509
Canonical Wnt receptor signaling pathway	0060070
Non-canonical Wnt receptor signaling pathway	0035567
Notch signaling pathway	0007219
Hedgehog signaling pathway	0007224

Ermittlung gemeinsamer potentiell gebundener Regionen aus ChIP-seq Daten zweier Transkriptionsfaktoren.

Um solche genomische Regionen zu ermitteln, die von zwei verschiedenen Transkriptionsfaktoren, oder von Wildtyp und Mutante in den ChIP-seq Daten gebunden wurden, wurden alle peaks oberhalb einer IDR von 0,01 (siehe 3.5.2 unter IDR-Analyse) mit dem bioinformatischen Werkzeug *Intersect* (Galaxy-Plattform auf <https://main.g2.bx.psu.edu/>) bearbeitet. Dieser Befehl vergleicht die Sequenzkoordinaten zweier Sequenz-Listen und sucht Sequenzen deren genomische Loci überlappen. In diesem Fall mußte der *Summit* (Basenpaarkoordinate mit höchster *Read*-Anreicherung in einem Peak) des ersten ChIP-seq Datensatzes innerhalb einem *Peaks* (gesamter Locus mit signifikant angereicherten *Reads*) des zweiten liegen.

3.6 Analyse der Runx2-knockout Microarrays

Für die Identifizierung von potentiellen Runx2-Zielgenen wurde auf die Expressiondaten von Humeri aus Runx2^{-/-} Mäusen (E14.5) zurückgegriffen. Diese Daten wurden mit Hilfe von Microarrays erstellt (Hecht, 2006) und von Jochen Hecht für eine erneute Durchsicht zur Verfügung gestellt.

4 Ergebnisse

Für die Identifizierung von Zielgenen der Transkriptionsfaktoren RUNX2 und MSX2 in der chondrogenen und osteogenen Differenzierung mittels ChIP-seq, wurden diese mit einem N-terminalen 3xFlag-Epitop fusioniert und retroviral in Hühner-Micromasskulturen exprimiert.

4.1 Test der Expressionskonstrukte auf ihre biologische Aktivität

Vor der Verwendung der Flag-Fusionskonstrukte zur genomweiten Analyse der Protein-DNA-Interaktionen mittels ChIP-seq wurde zunächst ein Test ihrer biologischen Aktivität durchgeführt, um einen Funktionsverlust durch die Fusion mit dem 3xFlag-Tag auszuschließen.

4.1.1 Überexpression von 3xFlag-RUNX2 und 3xFlag-MSX2 in Hühner-Micromasskulturen

Der Einfluss auf die Differenzierung von Hühner-Micromasskulturen durch die retroviral vermittelte Expression von *3xFlag-RUNX2* und *3xFlag-MSX2* im Vergleich zur Kontrolle wurde mittels histologischer Färbungen der Gesamtkulturen untersucht. Dies geschah über einen Zeitraum von 9 Tagen. An jedem dritten Tag wurden sowohl Kulturen für die Paraffineinbettung fixiert, als auch RNA für die Quantifizierung mittels qRT-PCR aufbereitet. Beide Transkriptionsfaktoren beeinflussten die Differenzierung der mesenchymalen Zellen, wie nach ihrer bereits bekannten Funktion erwartet.

Retroviral vermittelte Expression von 3xFlag-RUNX2

Die retrovirale Expression von RCASBP-*3xFlag-RUNX2* führte zu einer verstärkten Alcian-Blau-Färbung. Dies zeigt eine verstärkte Produktion von Knorpelmatrix (Abbildung 4.1). Dabei ist auffällig, dass sich die typischen chondrogenen Zentren bereits früher formen (Abbildung 4.1 C, Pfeil). Daneben produzieren auch mehr Zellen Knorpelmatrix, erkennbar durch den vergrößerten Durchmesser des Alcian-Blau-gefärbten Zentrums, verglichen mit leer-RCASBP infizierten Kontrollen (vergleiche Abbildung 4.1 A und C, D und F, sowie G und I).

Die ALP-Färbung detektiert die Aktivität des Osteoblastenmarkers *Alkalische Phosphatase 2* (AKP2). ALP-positive Zellen befinden sich in der Kontrolle vor allem in der Peripherie der Kulturen (Abbildung 4.1 M und P, weiße Pfeilspitze), während die Kondensationen im Zentrum

ALP-negativ bleiben. In den *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen exprimieren auch diese ALP (Abbildung 4.1 L, O und R).

Retroviral vermittelte Expression von 3xFlag-MSX2

Die retrovirale Expression von *3xFlag-MSX2* hat eine Inhibition der Differenzierung zur Folge (Abbildung 4.1). Vor allem in der Alcian-Blau-Färbung wird die stark verminderte Bildung von chondrogenen Kondensationen und verminderte Produktion von Knorpelmatrix im Zentrum der Kulturen deutlich (Abbildung 4.1 B, E und H). Der Osteoblastenmarker *AKP2* wird mittels ALP-Färbung nur in der Peripherie detektiert (Abbildung 4.1 K, N und Q, weiße Pfeilköpfe). Verglichen mit der Kontrolle ist dieser ALP-gefärbte äußere Kranz schmaler. Dadurch zeigt sich deutlich eine breitere Zone um das chondrogene Zentrum der Kondensationen, die weder durch Alcian-Blau, noch ALP-Färbung gefärbt wird (vergleiche Abbildung 4.1 P und Q, schwarze Pfeilspitze).

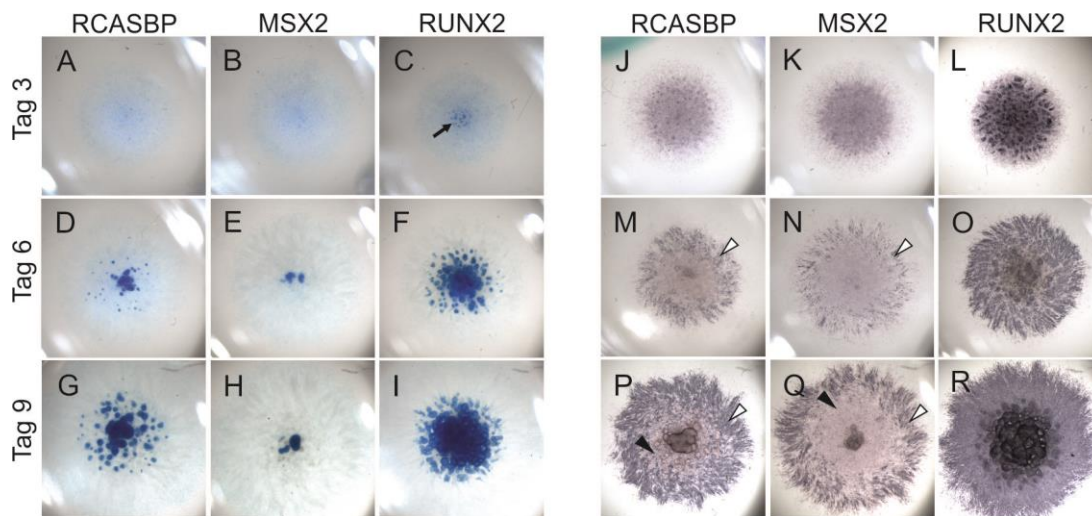


Abbildung 4.1 Histologische Färbung von Hühner-Micromasskulturen. Die Kulturen wurden an Tag 3, 6 und 9 nach Infektion mit Leer-RCASBP (RCAS), RCASBP-*3xFlag-MSX2* (Msx2), oder RCASBP-*3xFlag-RUNX2* (Runx2) fixiert und entweder Alcian-Blau gefärbt (A-I), oder ein ALP-Aktivitätstest durchgeführt (J-R). Die Alcian-Blau-Färbung der *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen zeigt eine stark gehemmte Produktion von Knorpelmatrix im Vergleich zur Kontrolle und deutet auf eine verminderte Differenzierung von Chondrozyten. Dagegen ist in *3xFlag-RUNX2* infizierte Kulturen die Matrixproduktion deutlich verstärkt und beginnt frühzeitig (Pfeil in C). Die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als Marker osteogener Zellen ist hauptsächlich auf die Peripherie der Kulturen begrenzt und in *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen deutlich reduziert verglichen mit der Kontrolle (weiße Pfeilspitze in M und N, bzw. P und Q) Dies hat eine breite Zone aus ALP-negativen Zellen zur Folge (schwarze Pfeilspitze in P und Q).

Expression von Differenzierungsmarkern in 3xFlag-RUNX2 und 3xFlag-MSX2 infizierten Hühner-Micromasskulturen

Zur weiteren Validierung der Funktionalität der Expressionkonstrukte wurde die Expression von molekularen Markern der chondrogenen und osteogenen Differenzierung in Hühner-Micromasskulturen unter Überexpression von *3xFlag-RUNX2* und *3xFlag-MSX2* mittels quantitativer PCR ermittelt und relativ zur Leer-RCASBP-infizierten Kontrolle bestimmt (Abbildung 4.2). Dafür wurde RNA aus 9 Tage alten Kulturen verwendet.

Collagen 2a1 (COL2A1) ist in der embryonalen Entwicklung in frühen Chondrozyten exprimiert. Die Expression von *COL2A1* in *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen bleibt nahezu unverändert und ist in *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen leicht herunterreguliert. Hingegen steigt die Expression von *Collagen 10a1 (COL10A1)*, welches *in vivo* in hypertrophen, ausdifferenzierten Chondrozyten exprimiert ist, in *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen auf das fast 4-fache der Expression in der Kontrolle. In *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen sinkt die *COL10A1* Expression auf lediglich ca. 10% der Expression in der Kontrolle.

Anders zeigt sich die Situation für *Collagen 1a1 (COL1A1)*, dass während der embryonalen Entwicklung in Osteoblastenvorläuferzellen des Perichondriums exprimiert wird. Während die Expression von *COL1A1* sich in den *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen kaum ändert, steigt sie in den *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen auf das Zweifache der Kontrolle. Der Differenzierungsmarker *bone sialoprotein 2 (IBSP)*, der embryonal sowohl im osteogenen Teil des Perichondriums bzw. Periosts, als auch in den Osteoblasten des primären Ossifikationszentrums exprimiert ist, ist in *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen ca. 3-fach hochreguliert, zeigt aber in *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen keinen deutlichen Unterschied zur Kontrolle. Die Expression des späten Osteoblastenmarkers *Osteocalcin (BGLAP)* ist sowohl in *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen, als auch in *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen nur marginal erhöht, verglichen mit der Kontrolle.

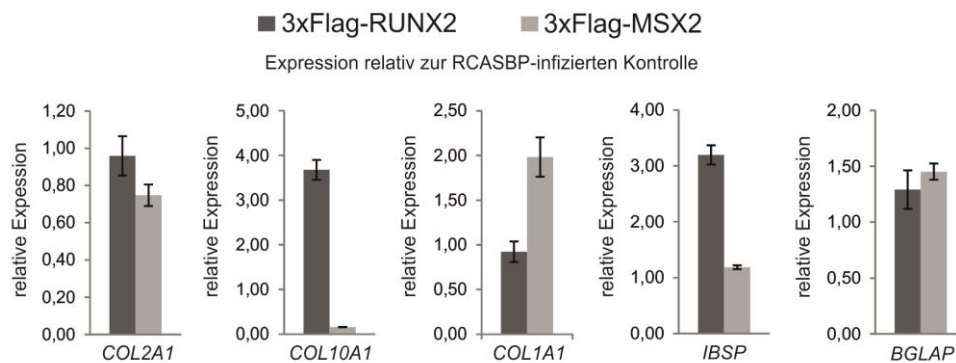


Abbildung 4.2 Regulation verschiedener Differenzierungsmarker in *3xFlag-RUNX2*- oder *3xFlag-MSX2*-infizierten Hühner-Micromasskulturen. Die Expression von Differenzierungsmarkern wurde mittels quantitativer PCR ermittelt und relativ zur Leer-RCASBP-infizierten Kontrolle bestimmt.

3xFlag-RUNX2 Expression in Hühner-Micromasskulturen führt zu einer veränderten histologischen Organisation

Für eine detaillierte Analyse der durch *3xFlag-RUNX2* induzierten morphologischen Veränderung in den Hühner-Micromasskulturen wurden zusätzlich histologische Querschnitte angefertigt und *in situ*-Hybridisierungen für *COL1A1* und *COL2A1* sowie eine histologische Fast-Green/Safranin-O-Färbung durchgeführt (Abbildung 4.3 und Abbildung 4.4).

Die Untersuchung des Expressionsmusters der zwei Marker in den *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen zeigte eine räumlichen Trennung von *COL1A1* und *COL2A1* positiven Zellen (Abbildung 4.3, A-D), trotz gleichmäßig verteilter *RUNX2*-Expression (Abbildung 4.3 E). Die *COL2A1* positiven chondrogenen Kondensationen waren von einem optisch stark hervortretenden Ring aus Zellen umschlossen, die *COL2A1*-negativ sind und waren in den Kontroll-Kulturen nicht so stark ausgeprägt (vergleiche Abbildung 4.3 A und B). Die Expression von *COL1A1* bildet schmale Linien, die sich durch die Kultur ziehen (Abbildung 4.3 C und D).

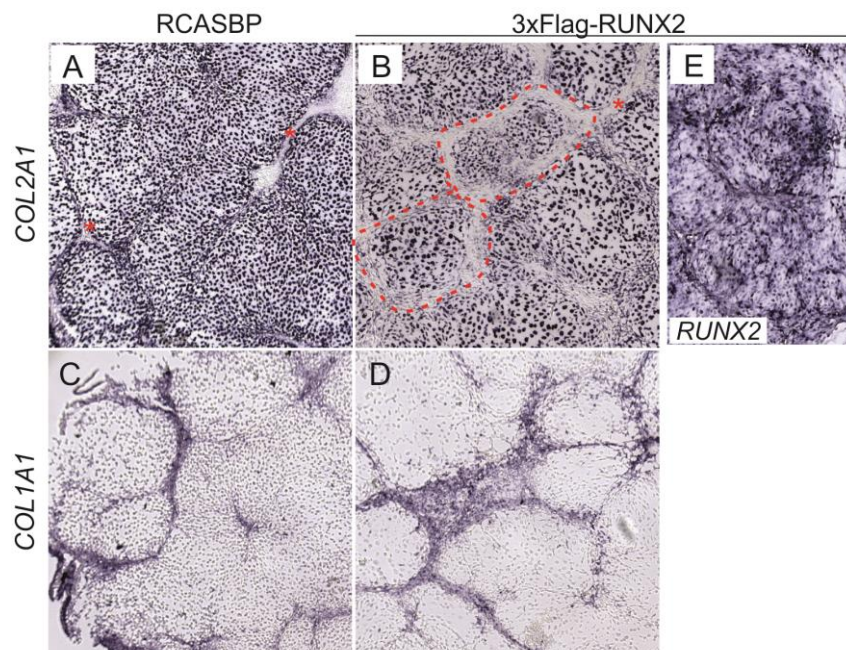


Abbildung 4.3 *In situ*-Hybridisierung von 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen auf histologischen Schnitten. Der Vergleich der räumlichen Expression von *COL2A1* (A und B) mit der von *COL1A1* (C und D) zeigt eine klare Aufteilung dieser Zellen innerhalb der Kulturen: In *3xFlag-RUNX2*-infizierten Kulturen zeigen sich deutliche *COL2A1*-negative ringartige Strukturen, die *COL2A1*-positiven Zellen umkreisen (rote Strichlinie und Stern in B) bei homogener *RUNX2*-Expression (F). Diese *COL2A1*-negativen Zellen zeigen sich nur vereinzelt in leer-RCASBP-infizierten Kulturen (roter Stern in A).

Die Fast Green- / Safranin-O-Färbung in 12 Tage alten *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen bestätigt eine fortgeschrittene chondrogene Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten (Abbildung 4.4 B, Pfeil). Die blau gefärbten Zellkerne zeigen auch hier deutliche Trennungen in Bereiche aus vorwiegend hypertrophen Chondrozyten und Zellen, die diese umranden (Abbildung 4.4 B, gelbe Strichlinie).

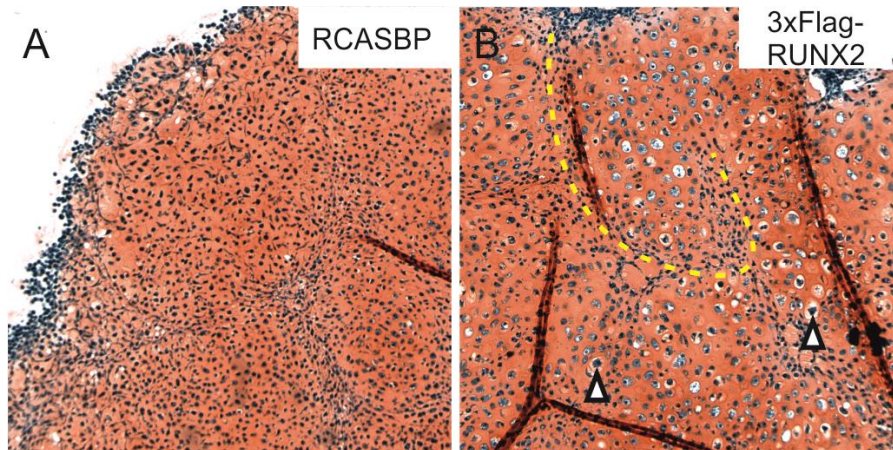


Abbildung 4.4 Chondrogene Zelldifferenzierung in histologischen Schnitten von retroviral infizierten Hühner-Micromasskulturen. Gezeigt ist eine Fast Green / Safranin-O-Färbung in 12 Tage alten leer-RCASBP- (A) sowie *3xFlag-RUNX2*-infizierten Kulturen (B). Diese zeigt die im Vergleich zu den leer-RCASBP-infizierten Kulturen gesteigerte Anzahl von hypertrophen Chondrozyten in *3xFlag-RUNX2*-infizierte Kulturen, die leicht an der deutlich vergrößerten Fläche der Zellen zu erkennen sind (B, Pfeilspitzen). Die hypertrophen Chondrozyten sind begrenzt durch eine dichtere gepackte Zellschicht von nicht hypertrophen Chondrozyten (gestrichelte gelbe Linie).

4.2 Genomweite Identifizierung von RUNX2- und MSX2-Bindestellen in Hühner-Micromasskulturen mittels ChIP-seq

Für jeden Transkriptionsfaktor wurden zwei biologische Replikate mit Chromatin aus 9 Tage alten RCASBP-3xFlag-RUNX2- (3xFlag-RUNX2) oder RCASBP-3xFlag-MSX2- (3xFlag-MSX2) infizierten Hühner-Micromasskulturen angefertigt und für ChIP-seq Experimente verwendet. Die Analyse der Sequenzdaten aus der 3xFlag-RUNX2-ChIP-seq ergab 12359 reproduzierbar gebundene Regionen (Peaks) oberhalb einer *Irreproducible Discovery Rate* (IDR) von 0,01. Für die 3xFlag-MSX2-ChIP-seq wurden 10986 reproduzierbare Peaks oberhalb einer IDR von 0,01 ermittelt.

4.2.1 Motivanalysen der potentiellen Bindestellen

Für eine Übersicht der gebundenen Motive wurden für die 5000 stärksten Peaks die überrepräsentierten Sequenzen zwischen 6 und 12 bp Länge ermittelt (Abbildung 4.5). Die Anzahl der Peaks entspricht in etwa der Hälfte der Peaks oberhalb einer IDR von 0.01 für RUNX2 und MSX2. In den RUNX2-gebundenen Regionen ist am stärksten das Runx2-Konsensmotiv TGYGGB vertreten. Motive auf den Plätzen zwei und drei entsprechen dem ersten Motiv, aber jeweils um eine Base kürzer. Das vierte Motiv enthält, anstelle des Thymin/Cytosin an Position 3 des ersten Motivs, ein Adenin.

In den MSX2-gebundenen Regionen wurden hingegen stark unterschiedliche Motive ermittelt. An den geringeren E-Werten ist jedoch erkennbar, dass keines davon ähnlich stark überrepräsentiert ist, wie das Runx-Motiv in der RUNX2-Motifanalyse. Auch entspricht keines der ermittelten Motive dem Msx2-Konsensmotiv, welches in *in vitro* Experimenten für Msx2 von Berger et al. 2008 bestimmt wurde.

Interessanterweise ist in den MSX2-gebundenen Sequenzen der 5000 stärksten Peaks an vierter Stelle auch das Runx-Motiv TGYGGY angereichert, und entspricht dem häufigsten Motiv in den RUNX2-gebundenen Regionen.









RUNX2 überrepräsentierte Motive		E-Wert DREME	MSX2 überrepräsentierte Motive		E-Wert DREME
IUPAC-Code	DREME-Logo		IUPAC-Code	DREME-Logo	
1. TGYGGB		3.0e-924	1. GCSAR		8.5e-168
2. GYGGY		9.5e-246	2. CAATSAR		9.7e-103
3. BGGYT		3.5e-102	3. TGAVTCAB		4.0e-069
4. TGAGGTHD		6.5e-073	4. TGTGGY		1.8e-044

Abbildung 4.5 Überrepräsentierte Motive in den von 3xFlag-RUNX2 und 3xFlag-MSX2 gebundenen Sequenzen. Diese wurden mit DREME für die jeweils 5000 stärksten Peaks ermittelt und die vier stärksten Motive mit den zugehörigen E-Werten nach sinkender Wahrscheinlichkeit aufgelistet.

4.2.2 Validierung potentieller Zielgenen von RUNX2

Die Motivanalyse der 3xFlag-RUNX2-ChIP-seq ergab die Anreicherung des spezifischen Runx-Konsensmotivs. Daher ist davon auszugehen, dass diese Sequenzen unmittelbar von 3xFlag-RUNX2 gebunden wurden.

Um zu überprüfen ob sich die durch die ChIP-seq-Analysen identifizierten Sequenzen als potentiellen Zielsequenzen von RUNX2 bestätigen lassen, wurden die Promotoren potentieller Zielgene auf das Vorhandensein von RUNX2-Peaks hin untersucht. Dabei wurden Gene gewählt, von denen schon aus vorhergehenden Arbeiten eine Regulation durch RUNX2 vermutet wurde. Hierzu gehören z.B. *CADHERIN 2* und *WNT5A*.

Das potentielle Zielgen CADHERIN 2

Der *CADHERIN 2* (*CDH2*)-Promotor gehört zu den von RUNX2 gebundenen Regionen in den 3xFlag-RUNX2 infizierten Hühner-Micromasskulturen. Die Expression von *CDH2* zu diesem Zeitpunkt wurde mittels quantitativer PCR relativ zur Kontrolle ermittelt und zeigte, dass *CDH2* in diesen Kulturen 4,7-fach hochreguliert war (Abbildung 4.6 D). In Luziferase-Assays in CV-1 Zellen zeigte sich, dass die Expression von *RUNX2* die Luziferaseaktivität eines Reportervektors bei Vorhandensein eines *CDH2*-Promotorelements erhöht (Abbildung 4.6 C). Die nicht DNA-bindende RUNX2-Variante mit einer Q209R Mutation zeigte hingegen keine Regulation des *CDH2*-Promoters.

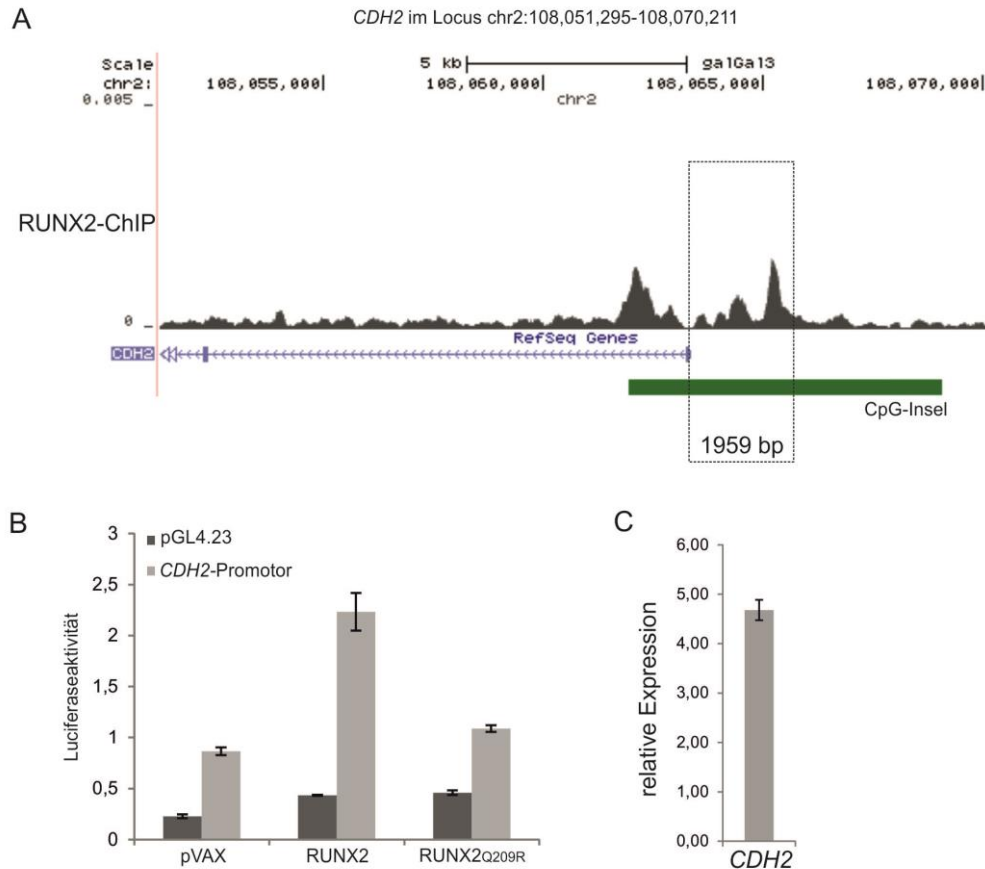


Abbildung 4.6 Validierung des potentiellen RUNX2-Zielgens *CADHERIN 2*. A) Ausschnitt aus dem UCSC-Genom-Browser mit Sequenz-Verteilung der 3xFlag-RUNX2-ChIP-seq am *CDH2*-Locus. Die für die Luciferase-Experimente klonierte Promotorregion ist durch einen Kasten markiert. B) RUNX2 aktiviert die Luciferaseaktivität in CV1-Zellen nach Transfektion zusammen mit dem *CDH2*-Promotorelement im Gegensatz zur Kontrolle (pVAX) oder der RUNX2-Mutante Q209R. C) Die Expression von *CDH2* in 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen relativ zu leer-RCASBP-infizierten Kulturen.

Das potentielle Zielgen WNT5A

In den Ergebnissen der 3xFlag-RUNX2-ChIP-seq konnte eine Bindung an das erste Intron von *WNT5A* beobachtet werden, in dem auch eine CpG-Insel liegt (Abbildung 4.7A). Damit kam diese von RUNX2 gebundene Region als mögliche regulatorische Region für *WNT5A* in Betracht. Mittels quantitativer PCR von RNA aus 3xFlag-RUNX2 infizierten Hühner-Micromasskulturen konnte gezeigt werden, dass *WNT5A*, im Vergleich zur Kontrolle ca. 3-fach hochreguliert war (Abbildung 4.7 D). Die der RUNX2-Bindung zugeordnete DNA-Sequenz wurde in einem Luciferase-Assay in CV1-Zellen auf eine mögliche Regulation durch RUNX2 überprüft. Jedoch zeigte die Expression von RUNX2 und der nicht DNA-bindende *RUNX2*^{Q209R}-Variante keine Veränderung der Luciferaseaktivität.

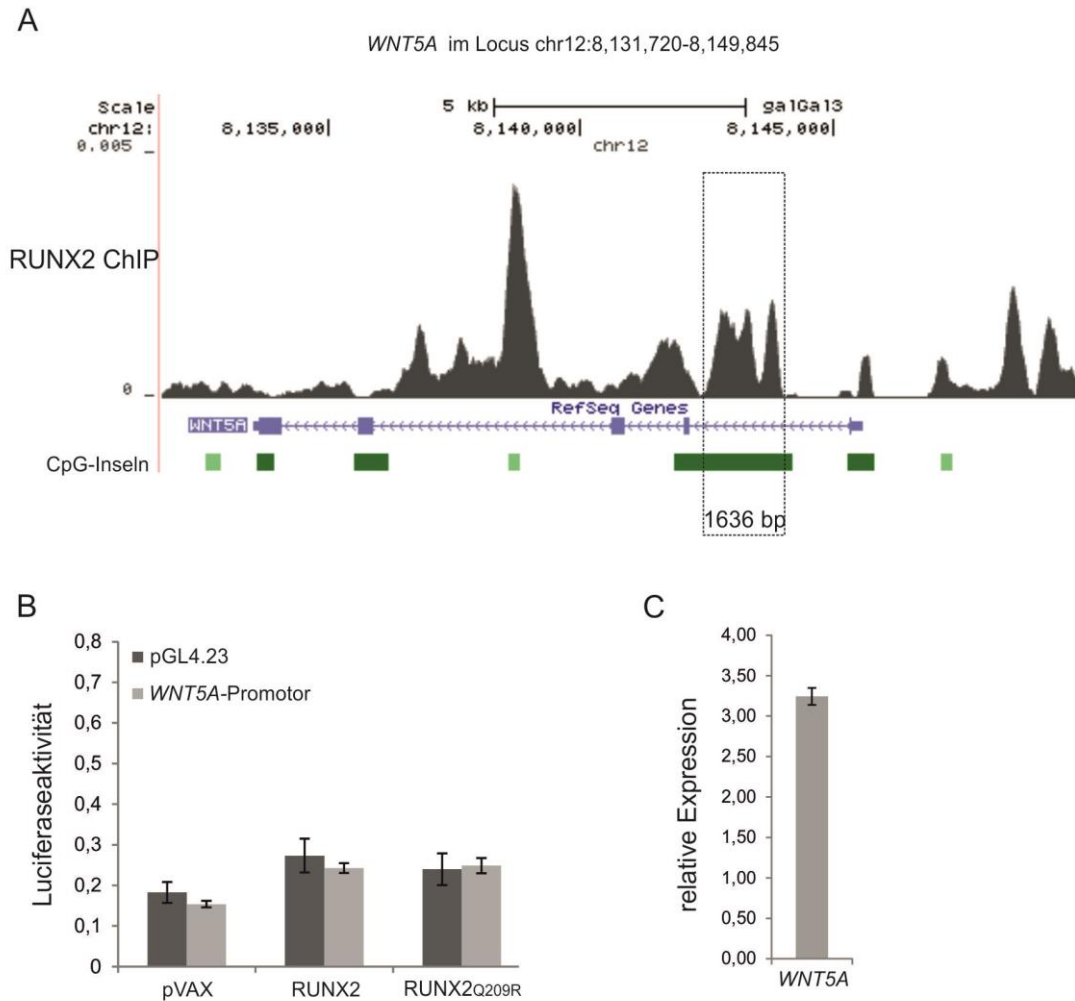


Abbildung 4.7 Das potentielle Zielgen *WNT5A*. A) Ausschnitt aus dem UCSC-Genom-Browser mit Sequenz-Verteilung der *3xFlag-RUNX2*-ChIP-seq am *WNT5A*-Locus. Die für die Luciferase-Experimente klonierte Region ist mit einem Kasten markiert. B) Luciferaseaktivität in CV1-Zellen unter Verwendung des *WNT5A*-Promotors. Weder RUNX2 noch die RUNX2-Mutante Q209R haben einen Einfluss auf die Luciferaseaktivität in CV1-Zellen, verglichen mit der Leer-Vektor-Kontrolle (pVAX). C) Die Expression von *WNT5A* in 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen relativ zu leer-RCASBP-infizierten Kulturen.

Das potentielle Zielgen *HEY1*

Eine erneute Auswertung von Microarray-Daten, die in der Arbeitsgruppe vor Beginn dieser Arbeit durchgeführt wurden (Hecht, 2006) ließ darauf schließen, dass der Notch-Signalweg-Effektor *Hey1* (*Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1*) möglicherweise direkt durch Runx2 reguliert wird: In den Humeri von *Runx2*-knockout Embryonen war *Hey1* 10-fach niedriger expremiert, verglichen mit Wildtyp-Embryonen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1 Regulierte Gene in Humeri von *Runx2*-knockout Mäusen zum Zeitpunkt E14.5 verglichen mit Wildtypen. Die Tabelle zeigt die Top 30 herunterregulierten Gene aus *Runx2*-knockout Microarrays. Die Daten wurden von Jochen Hecht generiert (Hecht, 2006) und in dieser Arbeit erneut durchgesehen.

Gensymbol	Name	n-fach reguliert
<i>Ibsp</i>	Integrin binding sialoprotein	0,0002
<i>Col10a1</i>	Procollagen, type X, alpha 1	0,0014
<i>Mmp13</i>	Matrix metalloproteinase 13	0,0045
<i>Spp1</i>	Secreted Phosphoprotein 1	0,0156
<i>IBSP</i>	Bone sialoprotein	0,0167
<i>Raldh3</i>	Retinaldehyde dehydrogenase 3	0,0167
<i>Phex</i>	Phosphate regulating neutral endopeptidases on the X chromosome	0,0206
<i>Mmp9</i>	Matrix metalloproteinase 9	0,0292
<i>Edg7</i>	Endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor 7	0,0292
<i>Cfh</i>	complement component factor h	0,0292
<i>Gelatinase</i>	Gelatinase	0,0359
<i>Phospho1</i>	Phosphatase, orphan 1	0,0442
<i>Epha3</i>	Eph-related receptor tyrosine kinase	0,0474
<i>Slit3</i>	Slit3	0,0508
<i>Mbp</i>	Myelin basic protein	0,0508
<i>Gpx3</i>	Glutathione peroxidase 3	0,0544
<i>Acp5</i>	Acid phosphatase 5, tartrate resistant	0,0583
<i>(Smpd3)</i>	Sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	0,0625
<i>Cfh</i>	Complement component factor h	0,0625
<i>Akp2</i>	Alkaline phosphatase 2	0,0625
<i>AK010095.1</i>	related to Collagen alpha 1(IX) chain precursor	0,0625
<i>Cbr1</i>	Carbonyl reductase	0,0670
<i>Cpz</i>	carboxypeptidase Z	0,0718
<i>IGnT B</i>	beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase B	0,0769
<i>Mbp</i>	Myelin basic protein	0,0769
<i>Lbd3</i>	LIM domain binding 3	0,0769
<i>CA3</i>	Carbonic anhydrase 3	0,0825
<i>BC020160</i>	RIKEN cDNA 4833422F24	0,0825
<i>BB104560</i>	RIKEN cDNA clone IMAGE:4983969	0,0884
<i>WT1</i>	WT1	0,0947
Hey1	Hairyenhancer-of-split related with YRPW motif 1	0,1015

HEY1 gehörte ebenfalls zu den Transkriptionsfaktoren, die durch *RUNX2* in der Nähe des Transkriptionsstarts gebunden waren: In der ChIP-seq zeigte sich eine sehr starke Sequenzanreicherung ca. 4300 bp stromaufwärts des ersten Exons (Abbildung 4.8 A). Eine Analyse der Expression mittels quantitativer PCR zeigte zudem, dass *HEY1* in Hühner-Micromasskulturen, die mit 3xFlag-*RUNX2*-Virus infiziert wurden, stark reprimiert ist (Abbildung 4.8 C). Die dem Peak entsprechende Sequenz wurde kloniert und in Luziferase-Experimenten in CV1-Zellen auf eine mögliche Regulation durch *RUNX2* untersucht. Die klonierte Region von *HEY1* weist keine Aktivität in dem verwendeten Reportervektor und den verwendeten Zellen auf (Abbildung 4.8 B). Dies ist daran zu erkennen, dass die Luziferaseaktivität ohne Kotransfektion eines Transkriptionsfaktors im Vergleich zum

pGL4.23-Leervektor nahezu unverändert bleibt. Jedoch zeigte die Expression von *RUNX2* eine Verringerung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur Leervektor-Kontrolle, in der das Reporterplasmid ohne *HEY1*-Promotorelement transfiziert wurde (Abbildung 4.8 B). *RUNX2*^{Q209R} reguliert die Luziferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls nicht.

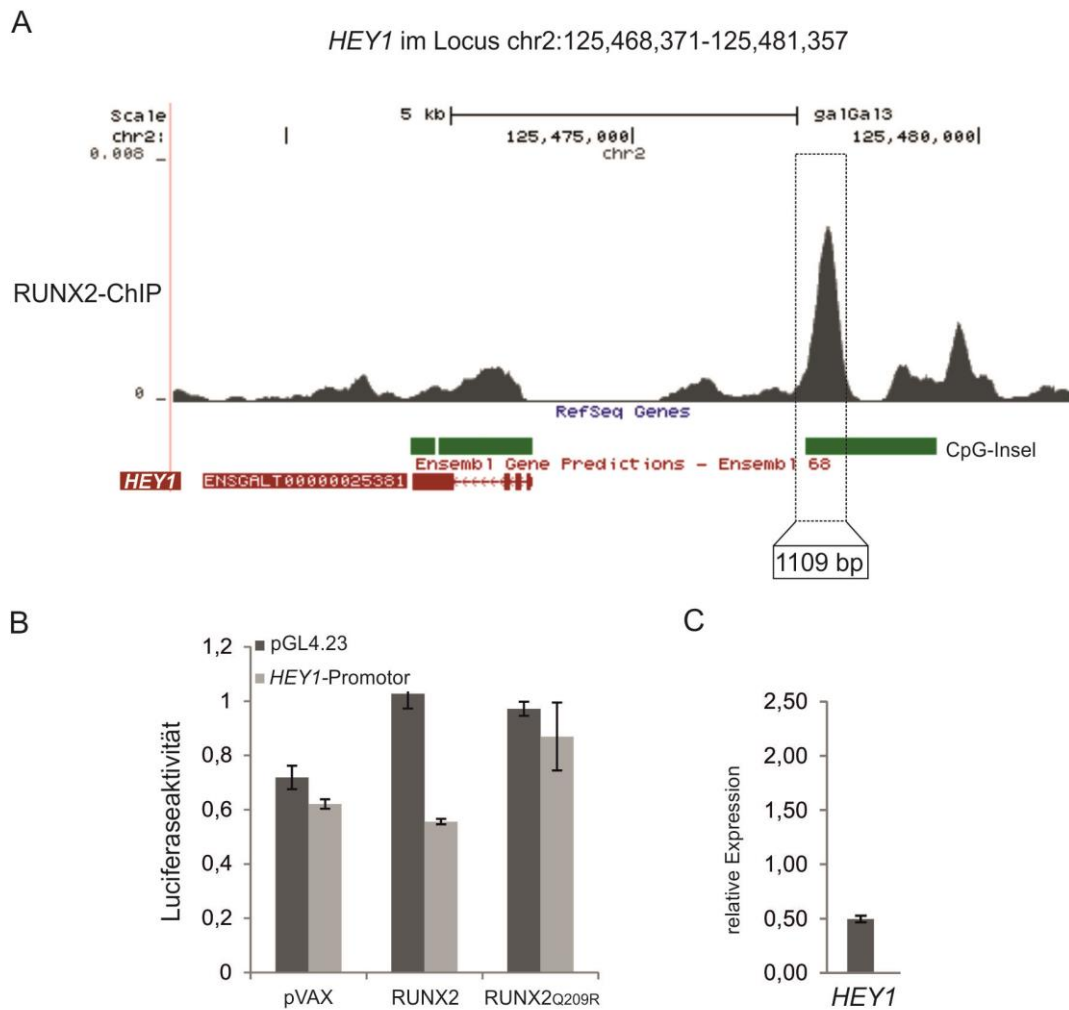


Abbildung 4.8 Das potentielle Zielgen *HEY1*. A) Ausschnitt aus dem UCSC-Genom-Browser mit Sequenz-Verteilung der *3xFlag-RUNX2*-ChIP-seq am *HEY1*-Locus und für Luziferase-Experimente klonierte Region (Kasten). B) Luziferaseaktivität in CV-Zellen unter Verwendung des *HEY1*-Promotors. *RUNX2* reprimiert die Luziferaseaktivität im Gegensatz zu der *RUNX2*-Mutante Q209R. C) Die Expression von *HEY1* in 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen relativ zu leer-RCASBP-infizierten Kulturen.

4.2.3 Identifizierung potentieller Zielgene von MSX2

In den Motivanalysen der von 3xFlag-MSX2 gebundenen Sequenzen konnte nicht das Msx2-Konsensmotiv BYAATTA identifiziert werden (Abbildung 4.5). Stattdessen zeigte sich, dass MSX2 verstärkt an Sequenzen bindet, in denen ein Runx-Motiv enthalten ist. Um die Möglichkeit zu untersuchen, dass diese von MSX2 gebundenen Sequenzen auch durch RUNX2 gebunden werden und beide an der Regulation derselben Gene beteiligt sind, wurden für die Identifikation von Zielgenen die Regionen ermittelt, die sowohl von MSX2 als auch von RUNX2 zur Zeit der Chromatinfixierung gebunden waren. Die Ermittlung der Regionen, die sowohl von 3xFlag-RUNX2 als auch von 3xFlag-MSX2 gebunden wurden ergab 1794 „geteilte“ Sequenzen (bzw. Peaks). Dies entspricht ca. einem Siebtel der RUNX2-Peaks und knapp einem Sechstel der MSX2-Peaks (Abbildung 4.9).

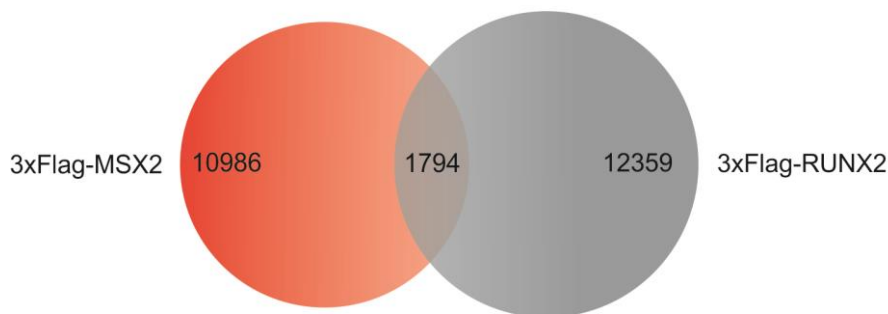


Abbildung 4.9 Anteil der von 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-RUNX2 geteilten Peaks. Das Venn-Diagramm zeigt 1794 geteilte Sequenzen, die sowohl in den jeweiligen CHIP-seq-Experimenten von 3xFlag-MSX2 bzw. 3xFlag-RUNX2 reproduzierbar gebunden wurden.

Genomweite Verteilung der MSX2 und RUNX2 gebundenen Regionen

Es könnte sein, dass die von 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-RUNX2 gebundenen Regionen eine lokale Präferenz im Genom haben, also z.B. eher in Promotoren oder intergenisch liegen. Um dies zu überprüfen wurde das Genom von *Gallus gallus* in die Klassen „Promotor“, „Exon“, „Intron“, „Gen-flankierend“ und „intergenisch“ unterteilt (Abbildung 4.10) und die Anzahl der Peaks in diesen ermittelt. Diese wurden in Prozent aller gezählten Peaks berechnet (Tabelle 4.2). Zum Vergleich wurde ebenfalls die prozentuale Verteilung von Peaks berechnet, die bei einer zufälligen Verteilung entsteht.

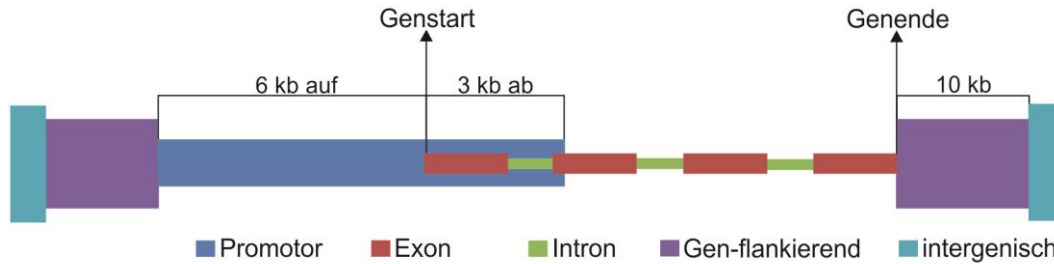


Abbildung 4.10 Unterteilung des Genoms in Klassen. Die Klassen „Exon“ und „Intron“ sind durch die Gen-Annotationen des Hühnergenoms, galGal3 (WASHUC2), vorgegeben. Für die Klasse „Promotor“ wurde ein Bereich von 6 kb stromaufwärts und 3 kb stromabwärts des Genstarts gewählt. „Gen-flankierende“ Bereiche betragen 10 kb aufwärts der Klasse Promotor, bzw. 10 kb stromabwärts des Gen-Endes. Die verbleibende genomische Sequenz viel in die Klasse „Intergenisch“.

Im Vergleich zur Verteilung aller MSX2-Peaks verteilen sich die MSX2/RUNX2-Peaks (geteilten Peaks), etwas häufiger in den Klassen „Promotor“ und „Gen-flankierend“ und etwas weniger oft in intergenische Regionen (Abbildung 4.10) und könnte ein Hinweis auf die Regulation gemeinsam gebundener Zielgene sein. Für die Identifizierung von potentiellen gemeinsamen RUNX2- und MSX2-Zielgenen wurden die Promotorregionen von den 17935 Ensembl-Referenzgenen auf eine Überlappung mit den geteilten MSX2- / RUNX2-Peaks aus den ChIP-seq Daten verglichen. Von den 17935 Promotorregionen der Referenzgene waren 748 von 3xFlag-RUNX2 bzw. 3xFlag-MSX2 gebunden. Die Genontologie-Analyse ergab unter den 748 potentiell gemeinsamen Zielgenen 19 Transkriptionsfaktoren, 7 Gene aus der *bone morphogenetic protein* (BMP)-Signalkaskade, insgesamt 4 Gene aus der Wnt-Signalkaskade, 8 Gene aus der Notch-Signalkaskade und 1 Gen aus der Hedgehog-Signalkaskade. Einige Gene waren in mehreren Gruppen vertreten, wurden hier aber nur einmal aufgeführt (Tabelle 4.3). Literaturrecherchen zu den potentiellen gebundenen Faktoren zeigten für einige der Gene Funktionen in der Knochenentwicklung.

Tabelle 4.2 Verteilung der 3xFlag-MSX2-Peaks, 3xFlag-RUNX2-Peaks und geteilten Peaks im Genom.

	Promotor	Exon	Intron	Gen-flankierend	intergenisch
MSX2	14,1	1,0	37,3	42,6	28,5
RUNX2	19,8	1,5	35,7	49,8	22,3
MSX2/RUNX2 geteilte Peaks	17,8	1,3	38,0	47,3	24,1
Anteil am Genom	12,0	2,1	32,2	37,6	36,8

Tabelle 4.3 Potentielle Zielgene von RUNX2 und MSX2. Für die Ermittlung potentieller Zielgene von RUNX2 und MSX2 wurden replizierbare ChIP-seqs Peaks verwendet, die in eine 6 kb große Region stromaufwärts, bzw. 3 kb große Region stromabwärts eines Transkriptionsstarts vielen. Die Auswahl der so ermittelten Gene wurden dann mittels Genontologie-Analysen auf solche mit Transkriptionsfaktor-Aktivität oder Mitglieder von Signalkaskade beschränkt.

Genesymbol	Genname
Transkriptionsfaktoren [GO:0008134]	
<i>ARID2</i>	AT-rich interactive domain-containing protein 2
<i>ARNT</i>	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator
<i>CENPF</i>	Centromere protein F
<i>DACT2</i>	Dapper homolog 2
<i>FOXP1</i>	Forkhead box K1
<i>FOXP3</i>	Forkhead box N3
<i>HIF1A</i>	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
<i>JMJD1C</i>	Jumonji domain-containing protein 2C
<i>JUN</i>	Transcription factor AP-1
<i>KAT6B</i>	Lysine acetyltransferase KAT6B
<i>LPIN1</i>	Lipin 1
<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1
<i>MED14</i>	Mediator complex subunit 14
<i>NLK</i>	Nemo-like kinase
<i>RUNX1</i>	Runt-related transcription factor 1
<i>SKI</i>	v-ski sarcoma viral oncogene homolog (avian)
<i>TBX5</i>	T-box transcription factor 15
<i>ZYX</i>	Zyxin
BMP-Signalweg [GO:0030509]	
<i>CYR61</i>	Cysteine-rich, angiogenic inducer 61
<i>FSTL3</i>	Follistatin-like 3
<i>ID1</i>	Inhibitor of DNA binding 1
<i>SMAD1</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 1
<i>SMAD3</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 3
<i>SMAD7</i>	Mothers against decapentaplegic homolog 7
<i>ZNF423</i>	Zinc finger protein 423
Wnt-Signalweg [GO:0060070 und GO:0035567]	
<i>CBY1</i>	Chibby 1
<i>GRHL3</i>	Grainyhead-like 3
<i>WNT5A</i>	Wingless-type NMTV integration site 5A
<i>WWTR1</i>	WW domain-containing transcription regulator protein 1
Notch-Signalweg [GO:0007219]	
<i>HEY1</i>	Hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif protein 1
<i>NOTCH2</i>	Neurogenic locus notch homolog protein 2
<i>ZNF423</i>	Zinc finger protein 423
Hedgehog-Signalweg [GO:0007224]	
<i>DYRK2</i>	Dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 2

Validierung potentieller Zielgene von RUNX2 und MSX2

Die potentiellen Zielgene von RUNX2 und MSX2 sind in Tabelle 4.3 aufgelistet. Nach Literaturrecherchen, sowie dem zuverigen Hinweis auf die Regulation des Notch-Effektors *Hey1* durch Runx2, wurden für weitere Analysen zur Identifikation von RUNX2- und MSX2-Zielgenen die Gene des Notch-Signalwegs *Neurogenic locus notch homolog 2 (NOTCH2)* und *HEY1* in Betracht gezogen.

4.2.4 Das potentielle Zielgen *NOTCH2*

Eine Betrachtung der Sequenz-Verteilung am *NOTCH2*-Genlocus zeigte vor allem in der 3xFlag-RUNX2-ChIP-seq ein deutliches Signal unmittelbar vor dem Transkriptionsstart von *NOTCH2* (Abbildung 4.12 A). Auch für 3xFlag-MSX2 wurde in der ChIP-seq ein Signal an dieser Stelle ermittelt. Weitere starke Signale wurden sowohl für 3xFlag-MSX2 als auch 3xFlag-RUNX2 über den gesamten Locus detektiert.

Um zu überprüfen, ob die Transkription von *NOTCH2* in *3xFlag-RUNX2* und *3xFlag-MSX2* infizierten Hühner-Micromasskulturen beeinflusst ist, wurde die *NOTCH2*-Expression in diesen Kulturen mittels quantitativer PCR und relativ zur Kontrolle ermittelt (Abbildung 4.12 D). Dabei zeigte sich, dass *NOTCH2* in *3xFlag-MSX2* infizierten Kulturen im Vergleich zu leer-RCASBP-infizierten Kontrollen ca. 6-fach hochreguliert war. In *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen konnte ein leichter Rückgang der *NOTCH2* Expression auf ca. 70 % der Kontrolle beobachtet werden. Da *NOTCH2* in einer hoch konservierten Signaltransduktionskaskade agiert, wurde die Expression von zwei *NOTCH2* Zielgenen, *HEY1* und *HES1 (hairy and enhancer of split 1)*, überprüft (Abbildung 4.11), wobei *HEY1* zu den potentiellen Zielgenen von RUNX2 und MSX2 gehört (Tabelle 4.3). Deutlich zeigt sich in den *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen eine Reduktion der *HEY1* und *HES1* Expression auf ca. die Hälfte der Expression in der Kontrolle. Die Überexpression von *3xFlag-MSX2* führt zu einer Hochregulation von *HEY1* und *HES1*. Die Expression des Notch-Liganden *Delta-like 1 (DLL1)* ist vor allem in den *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen hochreguliert. Dort erreicht sie fast das 6-fache der Expressionsstärke verglichen mit der Kontrolle. Auch die Überexpression von *3xFlag-MSX2* führt zu einer Steigerung der *DLL1* Expression. Hier wird etwa eine Zweifache Transkriptmenge relativ Kontrolle erreicht.

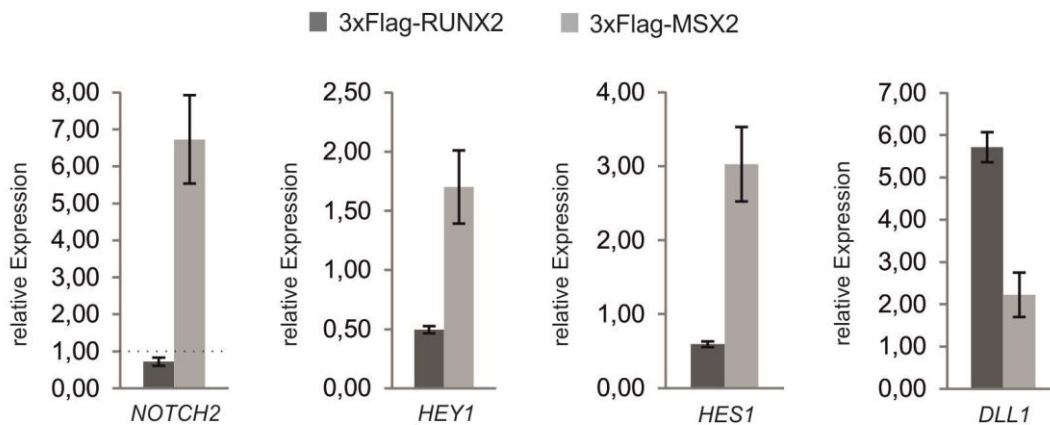


Abbildung 4.11 Regulation von verschiedenen Mitgliedern der NOTCH-Signalkaskade in 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen. Dies zeigt eine vorwiegend gegenläufige Regulation durch die Expression von 3xFlag-RUNX2 und 3xFlag-MSX2. Die Expression der Gene in 3xFlag-RUNX2 bzw. 3xFlag-MSX2 infizierten Kulturen wurde relativ zur Leer-RCASBP infizierten Kontrolle bestimmt.

Um die Möglichkeit einer direkten Regulation des *NOTCH2*-Promotors durch MSX2 und RUNX2 zu untersuchen, wurden Luziferase-Assays in CV1-Zellen durchgeführt (Abbildung 4.12 B und C). Wie in der qPCR-Analyse zeigte sich, dass MSX2 die Luziferaseaktivität des *NOTCH2*-Promoterkonstrukts positiv reguliert, während RUNX2 diese nicht signifikant beeinflusst. Allerdings war die Luziferaseaktivität durch die nicht DNA-bindende RUNX2^{Q209R}-Mutante und in Zusammenhang mit dem *NOTCH2*-Promotorelement leicht erhöht. Diese Beobachtung bestätigte sich auch bei der Transfektion der Wildtyp und Q209R-Variante des murinen Runx2-Homologs. Hier reprimierte das murine Runx2 sogar die Aktivität der Luziferase leicht, verglichen mit der leer-Vektor-transfizierten Kontrolle.

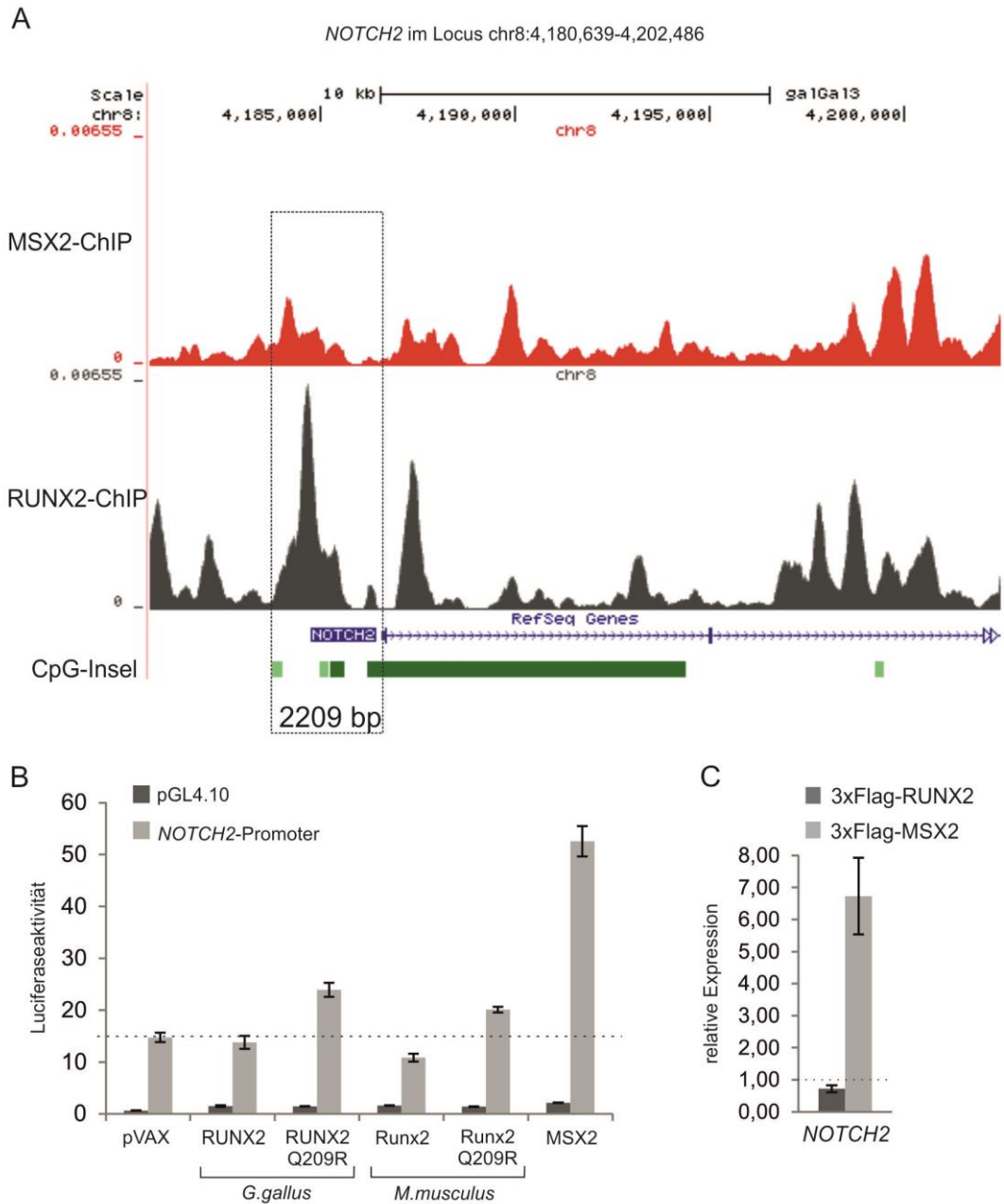


Abbildung 4.12 Regulation des potentiellen Zielgens *NOTCH2* durch *MSX2* und *RUNX2*. A) Ausschnitt aus dem UCSC-Genom-Browser mit Sequenz-Verteilung der 3xFlag-RUNX2- und 3xFlag-MSX2-ChIP-seq am *NOTCH2*-Locus und für Luziferase-Experimente klonierte Region (Kasten). B) Luziferaseaktivität in CV1-Zellen reguliert durch die klonierte *NOTCH2*-Promotorregion, sowie der Leer-Vektor-Kontrolle (pVAX), oder Überexpression der RUNX2- und RUNX2^{Q209R}-Homologe aus Hühnchen (*G.gallus*) und Maus (*M.musculus*) und MSX2 (*G.gallus*). C) Die Expression von *NOTCH2* in 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen relativ zu leer-RCASBP-infizierten Kulturen.

Das potentielle Zielgen *HEY1*

Am *HEY1*-Lokus zeigte sich in der 3xFlag-MSX2-ChIP-seq eine Sequenzanreicherung unmittelbar neben der von RUNX2 ca. 4300 bp vor dem Transkriptionsstart (Abbildung 4.13 und Abschnitt 4.2.2) und wurde daher als potentiell gemeinsames Zielgen identifiziert. Beide Peaks liegen in einer CpG-Insel und könnten möglicherweise eine Regulation von *HEY1* durch RUNX2 oder MSX2 bedeuten. *HEY1* war zudem sowohl durch die Expression von 3xFlag-RUNX2 als auch 3xFlag-MSX2 deutlich herunterreguliert (Abbildung 4.11). Luziferase-Experimente mit der von 3xFlag-MSX2 gebundenen Region konnten im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr durchgeführt werden, stehen aber im Rahmen weiterer Untersuchungen noch aus.

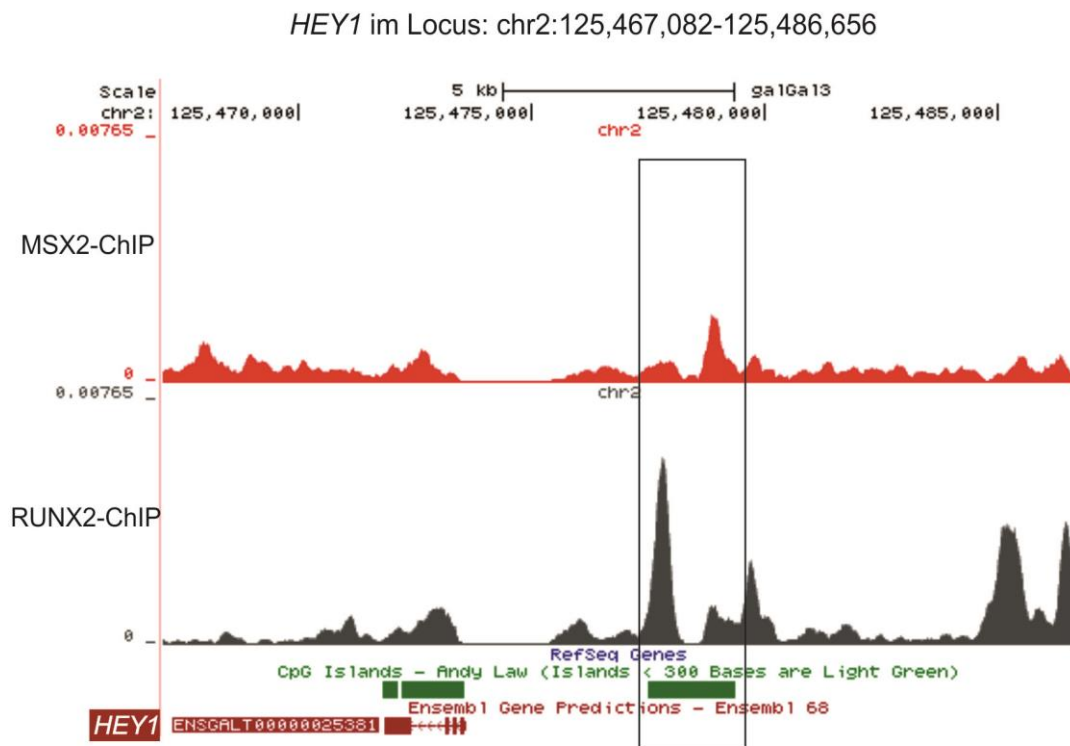


Abbildung 4.13 Ausschnitt aus dem UCSC-Genom-Browser um den *HEY1*-Locus. Die Sequenzanreicherungen der 3xFlag-MSX2-ChIP-seq sind in Rot dargestellt, darunter in grau die der 3xFlag-RUNX2-ChIP-seq. Der Rahmen markiert die Region der stärksten Anreicherung in beiden ChIP-seq-Experimenten vor dem *HEY1*-Gen. In grün sind die für diese Region annotierten CpG-Inseln eingetragen.

4.2.5 Die Inhibition der NOTCH-Signalkaskade in Hühner-Micromasskulturen

Die oben beschriebenen ChIP-seq Resultate und weiterführende Expressions- und Reporter-Analysen zeigten einen Einfluss von RUNX2 auf den Notch-Signalweg, vermutlich durch die Regulation von NOTCH2 und HEY1. Um festzustellen, ob die NOTCH-Signalkaskade auch eine endogene Funktion bei der Differenzierung der Micromasskulturen hat, wurde diese durch Zugabe des gamma-Secretase-Inhibitors DAPT (N-[N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butylester) blockiert. Die DAPT-Behandlung in den Kulturen über einen Verlauf von 12 Tagen führte zu einer verstärkten Knorpelmatrixproduktion, was sich in einer stärkeren Alcian-Blau-Färbung zu den untersuchten Zeitpunkten an Tag 6, 9 und 12 nach Aussaat der Zellen zeigte (Abbildung 4.14 A). Dabei konnte auch gezeigt werden, dass die Zunahme der Matrixproduktion mit Zunahme der DAPT-Konzentration steigt. Der maximale Unterschied konnte bei einer Behandlung mit 0,5 μ M DAPT beobachtet werden. Aufgrund der verstärkten Knorpelmatrixproduktion wurde die Expression von *RUNX2* mittels quantitativer PCR relativ zur DMSO-behandelten Kontrolle bestimmt (Abbildung 4.14 B). Dabei zeigte sich, dass in Abhängigkeit der verwendeten DAPT-Konzentration die *RUNX2*-Expression anstieg. Neben *RUNX2* wurden auch weitere molekulare Marker der Knorpel- und Knochendifferenzierung unter Inhibition der NOTCH-Signalkaskade mittels quantitativer PCR bestimmt (Abbildung 4.14 C). Dabei zeigte sich, dass das in prähypertrophen Chondrozyten exprimierte *Indian hedgehog (IHH)* 4-fach hochreguliert war. Ebenfalls deutlich hochreguliert war das in hypertrophen Chondrozyten exprimierte *COL10A1*. Ein besonders starker Anstieg zeigte sich für die Expression von *IBSP*, das ca. 20-fach hochreguliert war. Die Osteoblastenmarker *BGLAP* und *Osteopontin (SPP1)* waren im Vergleich zur Kontrolle zweifach hochreguliert.

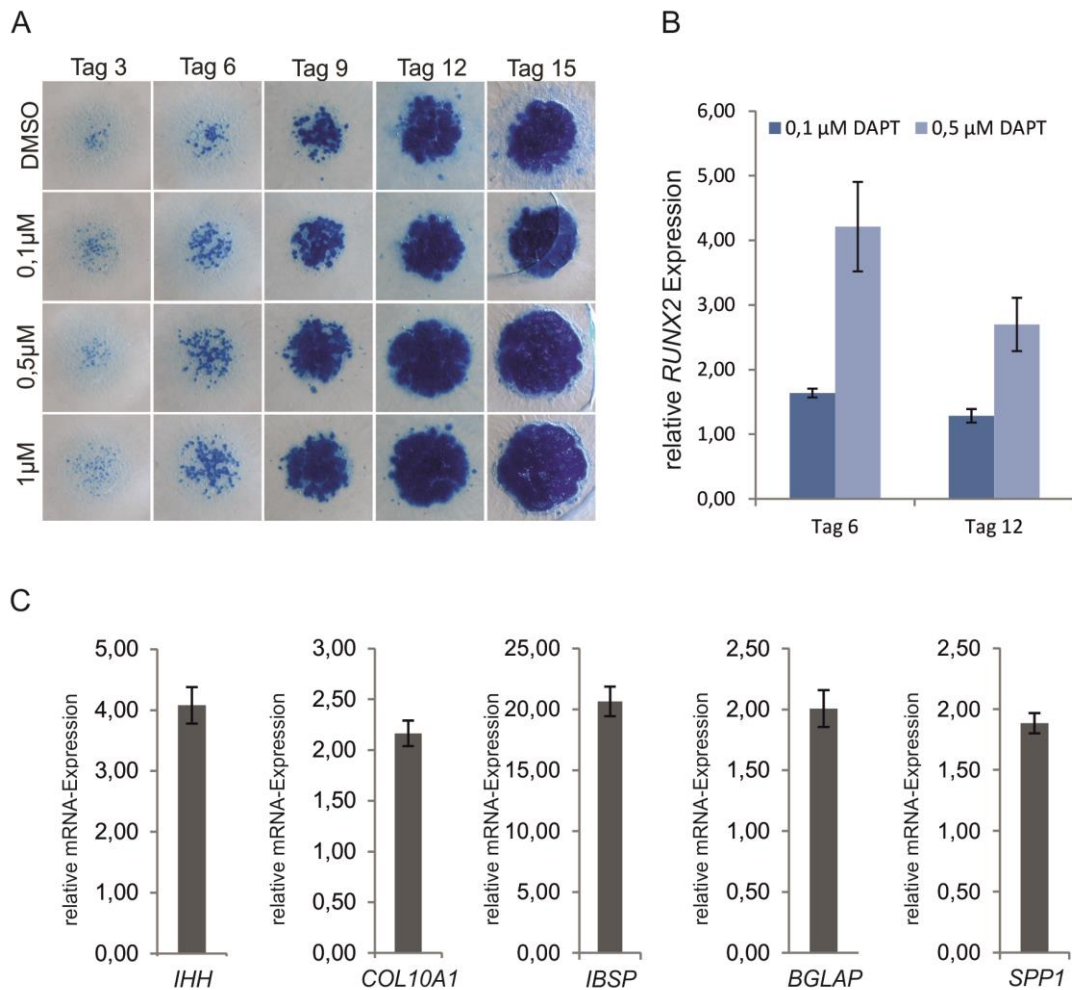


Abbildung 4.14 Inhibition der NOTCH-Signalkaskade. A) Alcian-Blau-Färbung als Maß der chondrogenen Differenzierung in Hühner-Micromasskulturen über einen Zeitraum von 3 bis 15 Tagen. Die Kulturen wurden mit 0,1μM, 0,5μM und 1μM DAPT bzw. DMSO (Kontrolle) behandelt. DAPT inhibiert die NOTCH-Signalkaskade und stimuliert die Differenzierung der Kulturen mit steigender Konzentration. B) Ermittlung der *RUNX2*-Expression mittels quantitativer PCR und relativ zur Expression in der DMSO behandelten Kontrolle. Die Inhibition der NOTCH-Signalkaskade führt zu einer gesteigerten *RUNX2*-Expression C) Expression von Differenzierungsmarkern in 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen, die mit 0,5μM DAPT behandelt wurden. Die Expression wurde mittels quantitativer PCR und relativ zur DMSO behandelten Kontrolle ermittelt und zeigt eine gesteigerte Expression von Differenzierungsmarkern durch die Inhibition der NOTCH-Signalkaskade.

4.2.6 Expression von Notch2 in Humeri während der murinen Embryonalentwicklung

Im Gegensatz zu *MSX2* regulierte *RUNX2* den *NOTCH2*-Promotor in den Luziferaseexperimenten kaum, jedoch liegt ein Zusammenhang des Notch-Signalwegs und *Runx2* auf Grund bisheriger Beobachtungen nahe. Um zu überprüfen, ob *Notch2* *in vivo* durch *Runx2* beeinflusst wird, wurde die Expression von *Notch2* in embryonalen Extremitätenknochen von *Runx2*-defizienten Mäusen mit wildtypischen Mäusen verglichen.

Eine Immunfluoreszenz-Färbung in Paraffinschnitten von Humeri aus wildtypischen Embryonen zum Zeitpunkt E15.5 zeigte ein starkes Notch2-Signal in den hypertrophen Chondrozyten (Abbildung 4.15 A und B). Auch in den hypertrophen Chondrozyten, sowie im Periost (Abbildung 4.15 C, D) des Radius und der Ulna war ein Signal erkennbar.

In den *Runx2*-defizienten Tieren war im Humerus kein Notch2-Signal detektierbar (Abbildung 4.15 E und F). Immunfluoreszente Aufnahmen des Notch2-Signals in Radius und Ulna der *Runx2*-defizienten Embryonen, deren Chondrozyten im Gegensatz zu denen im Humerus noch hypertroph werden, zeigten ebenfalls ein deutliches Signal (Abbildung 4.15 G und H). Ein Signal im Perichondrium konnte nicht beobachtet werden. Der immunhistologische Nachweis von Notch2 wurde ebenfalls mit einem weiteren Antikörper eines anderen Herstellers durchgeführt und zeigte das gleiche Expressionsmuster.

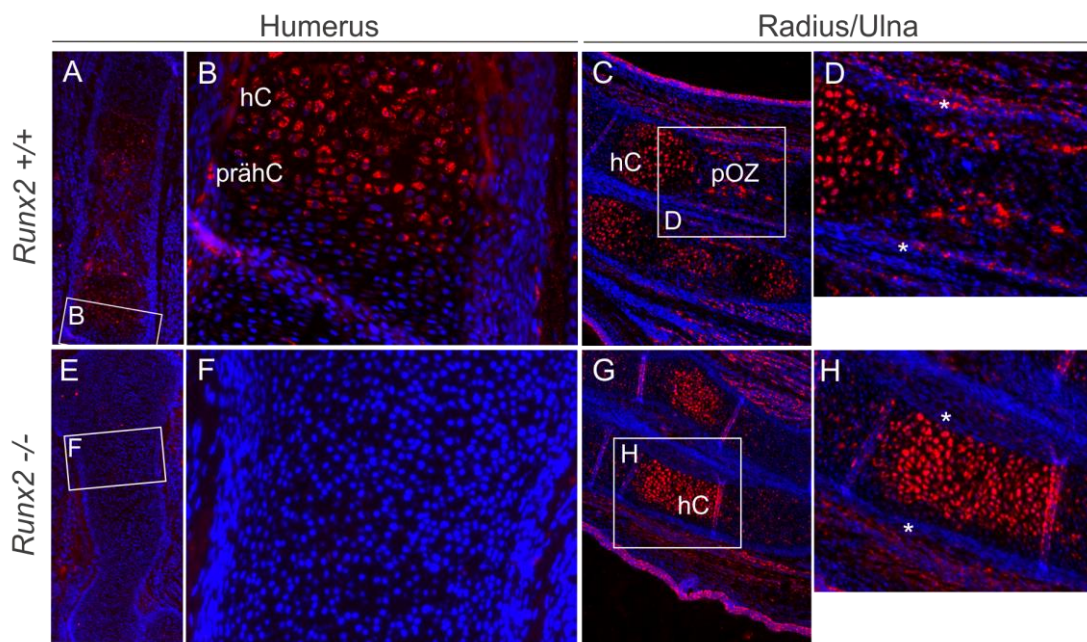


Abbildung 4.15 Immunfluoreszenz des anti-Notch2-Signals in histologischen Schnitten des Humerus, sowie Radius und Ulna von Wildtyp und *Runx2*-defizienten Embryonen (E15.5). In *Runx2*-defizienten Vorderextremitäten fehlt das Notch2-Signal im Humerus und im Perichondrium der Knochen im Zeugopod. *Blau*: DAPI-Färbung. *Rot*: Notch2-Signal. A-D: *Runx2*-Wildtyp. A) Diaphyse des Humerus. B) Die Vergrößerung des Ausschnittes in A zeigt das Notch2-Signal in prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten im Humerus. C) Notch2-Signal in Chondrozyten und primärem Ossifikationszentrum der Radius und Ulna, sowie in der Haut und teilweise Muskeln. D) Vergrößerung des Ausschnittes in C zeigt das Notch2-Signal auch im Periost (Stern). E-H: *Runx2 knockout* E) Aufnahme des Humerus. F) Vergrößerung des Ausschnittes in E zeigt kein Notch2-Signal in den Chondrozyten des Humerus. G) Notch2-Signal in den hypertrophen Chondrozyten des Radius und der Ulna. H) Vergrößerung des Ausschnittes in G zeigt das Notch2-Signal in hypertrophen Chondrozyten, aber nicht im Perichondrium (Stern). (hC = hypertrophe Chondrozyten; präC = prähypertrophe Chondrozyten; pOZ = primäres Ossifikationszentrum).

Veränderte Zellmorphologie im Humerus von *Runx2*-knockout Mäusen

Aufgrund der Beobachtung, dass Chondrozyten in Radius und Ulna von *Runx2*-knockout Mäusen noch *Notch2* exprimieren, aber nicht im Humerus, wurden die Zellen im Humerus von *Runx2*-knockout Mäusen genauer mit denen im Humerus von wildtypischen Mäusen zum Zeitpunkt E15.5 verglichen. Um die Morphologie der Zellen zu vergleichen, wurde die zelleigene Autofluoreszenz im grünen Kanal aufgenommen. Während der Differenzierung ändert sich die Morphologie der Zellen deutlich (Abbildung 4.16): In der Diaphyse des Wildtyp-Humerus sind hypertrophe Chondrozyten rundlich und groß, prähypertrophe Chondrozyten oval und proliferierenden Chondrozyten schmal und länglich (Abbildung 4.16 B und C).

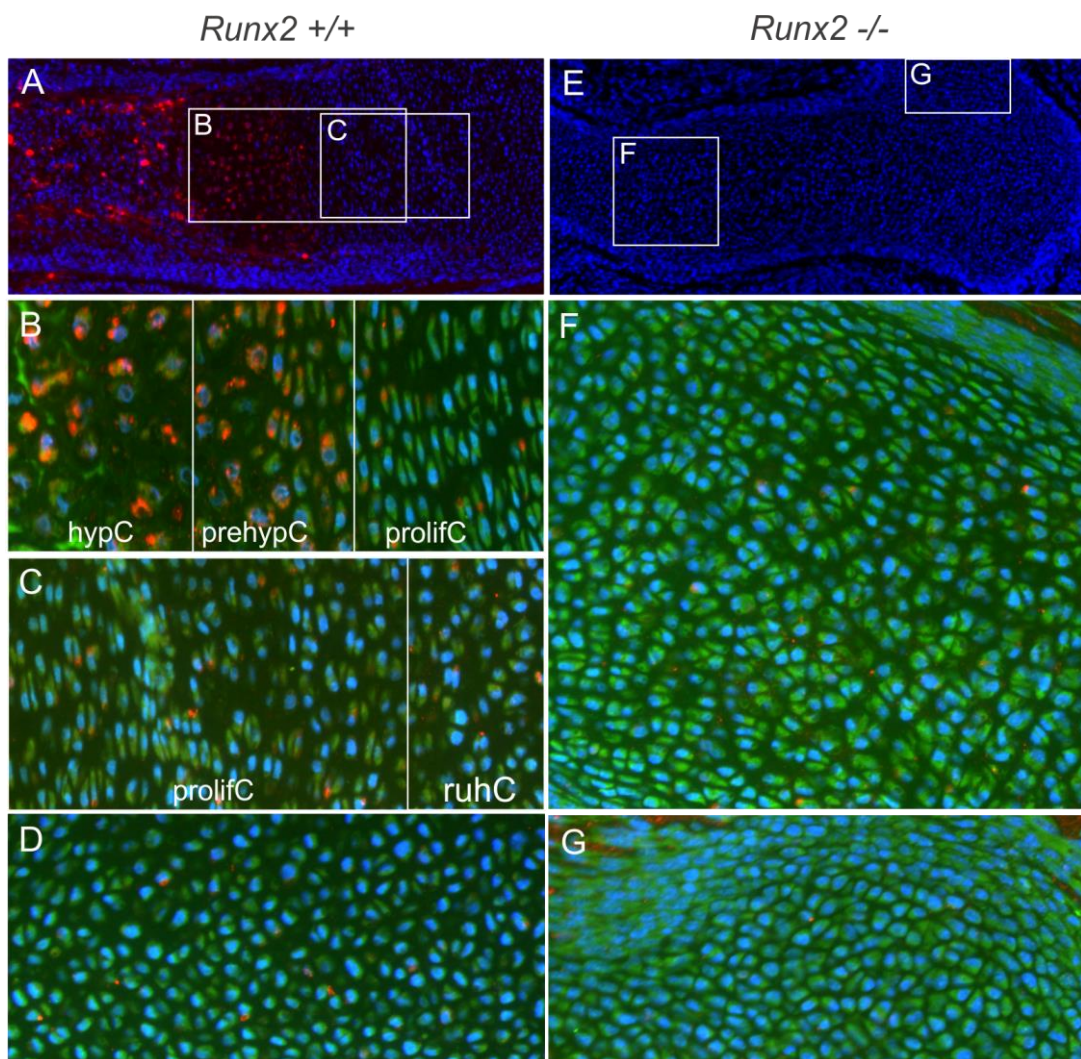


Abbildung 4.16 Morphologie von Chondrozyten im Humerus von *Runx2*^{+/+} und *Runx2*^{-/-} Mäusen (E15.5). Rot: Anti-Notch2. Grün: Eigenfluoreszenz der Zellen. Blau: DAPI. A-D) Die Morphologie der Zellen im Humerus mit proliferierenden (prolifC), prähypertrophen (prehypC) und hypertrophen (hypC) Chondrozyten (B und C) sowie ruhenden Chondrozyten (ruhC) der Epiphyse (C und D) unterscheidet sich deutlich im Humerus von *Runx2*^{+/+} Mäusen. E-G) Humerus von *Runx2*^{-/-} Mäusen. Die Morphologie der Chondrozyten in der Diaphyse des Humerus von *Runx2*^{-/-} Mäusen (F) ähnelt denen der ruhenden Chondrozyten des permanenten Knorpels in den Epiphysen (G).

In den knockout-Humeri sind diese unterschiedlichen Zellformen nicht mehr zu beobachten: Die Zellen in der Diaphyse des knockout-Humerus ähneln in ihrer Morphologie denen des permanenten Knorpels in den Epiphysen (vergleiche Abbildung 4.16 F mit G bzw. D).

4.2.7 Funktionelle Analysen des potentiellen RUNX2 und MSX2 Zielgens *NOTCH2* in Hühner-Micromasskulturen

Um zu überprüfen, ob und in wie fern NOTCH2 einen Einfluss auf die Knorpel- oder Knochendifferenzierung hat, wurden weitere Untersuchungen in Hühner-Micromasskulturen durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass eine Verminderung der Notch-Signalkaskade zu einer verstärkten Zelldifferenzierung in Hühner-Micromasskulturen führt (Abschnitt 4.2.5). Daher wurde eine ektope Aktivierung der Notch-Signalkaskade in Hühner-Micromasskulturen induziert um den daraus entstehenden Einfluss auf deren Differenzierung zu analysieren. Die Überexpression der intrazellulären Domäne von NOTCH2 (*NOTCH2-ICD*) führt zu einer konstitutiven Aktivierung des NOTCH-Signalwegs. Daher wurde die *NOTCH2-ICD* aus *G. gallus* N-Terminal mit einem 3xFlag-Epitop versehen und in den RCASBP-Vektor kloniert. Um die Funktionalität des Konstrukts zu testen, wurden DF1-Zellen mit den *NOTCH2-ICD-RCASBP*-Plasmid transfiziert und die virale Expression auf einem Western-Blot mit Zellysaten, sowie die nukleäre Lokalisation immuncytochemisch mit einem anti-Flag-Antikörpers bestätigt (Abbildung 4.17).

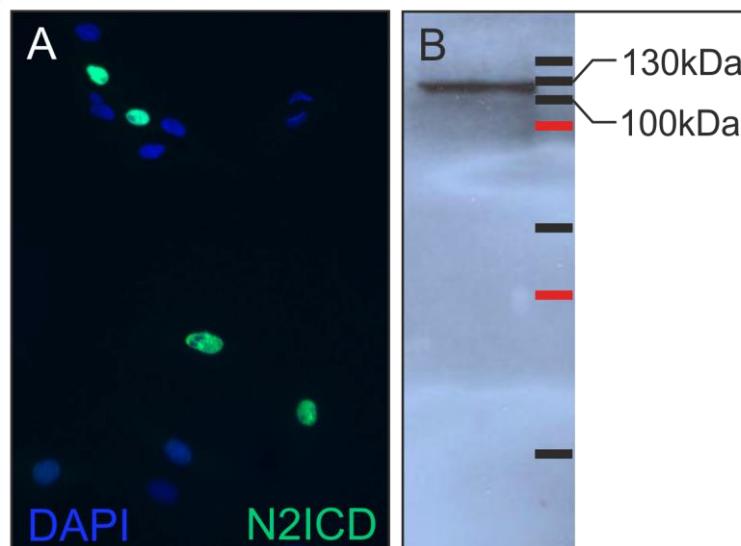


Abbildung 4.17 Expression von *Gallus gallus* 3xFlag-*NOTCH2-ICD* in DF-1-Zellen nach retroviraler Infektion mit RCASBP. A) Immunzytologische Färbung unter Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers zeigt die erfolgreiche Infektion der Zellen durch die Virenpartikel sowie die Lokalisation des 3xFlag-*NOTCH2-ICD* (N2ICD) im Kern. B. Westernblot mit DF-1 Zellysaten, und Detektion anti-Flag-Antikörper nach Transfektion der *NOTCH2-ICD*.

Um den Einfluss von NOTCH2 auf die Differenzierung von Hühner-Micromasskulturen zu testen, wurden diese mit *3xFlag-NOTCH2-ICD*-Virus infiziert und über einen Zeitraum von 12 Tagen beobachtet. Eine mögliche Inhibition der Differenzierung wurde mittels einer Alcian-Blau- und ALP-Färbungen überprüft, sowie die Expression verschiedener molekularer Differenzierungsmarker in 9 Tage alten Kulturen analysiert (Abbildung 4.18 A).

Der Vergleich der Alcian-Blau-Färbung zwischen den *3xFlag-NOTCH2-ICD* infizierten Kulturen und der Kontrolle zeigte keinen eindeutigen Unterschied (Abbildung 4.18 A).

Daher wurden zusätzlich noch einzelne Differenzierungsmarker untersucht. Der Vergleich der ALP-Färbung zeigte eine deutliche Reduktion der Alkalischen Phosphatase-Aktivität, vor allem in der Peripherie der Kulturen, dort, wo in der Kontrolle am meisten ALP-Aktivität nachzuweisen ist (Abbildung 4.18 B, schwarze Pfeilköpfe). Auch in der quantitativen PCR zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Expression von *AKP2* im Vergleich zur Kontrolle. Die Untersuchungen weiterer Differenzierungsmarker in der quantitativen PCR ergab eine um die Hälfte verringerte *COL10A1*-Expression und deutet auf eine verminderte Zahl hypertropher Chondrozyten und reduzierte Differenzierung durch die *3xFlag-NOTCH2-ICD* Expression hin (Abbildung 4.18 C). Am deutlichsten reduziert war die Expression des Osteoblastenmarkers *IBSP*. Die Expression betrug ca. das 0,2-fache relativ zur leer- RCASBP-infizierten Kontrolle. Die Expression von *BGLAP* blieb nahezu unverändert.

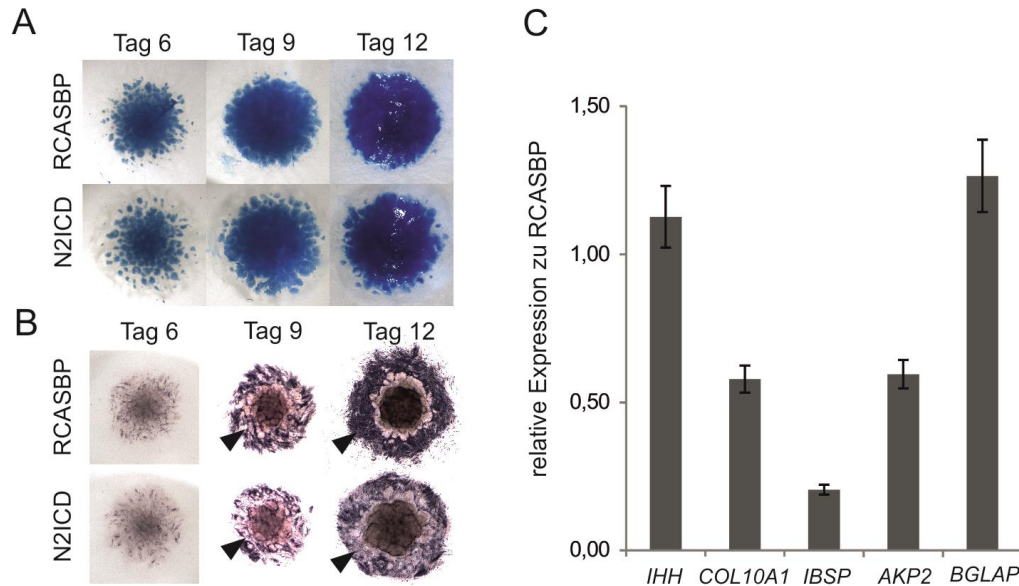


Abbildung 4.18 Retrovirale vermittelte Expression von *3xFlag-NOTCH2-ICD* in Hühner-Micromasskulturen. A) Die Alcian-Blau-Färbung an Tag 6 bis 12 als Maß der chondrogenen Differenzierung in *3xFlag-NOTCH2-ICD* (*N2ICD*) exprimierenden Hühner-Micromasskulturen verglichen mit leer-RCASBP-infizierten Kulturen zeigt keine Unterschied. Ein ALP-Aktivitätsnachweis an denselben Zeitpunkten (B) zeigt die verminderte Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der Peripherie der Kulturen verglichen zur Kontrolle (schwarze Pfeilspitzen). Dies deutet auf eine verminderte Differenzierung osteogener Zellen durch die ektopische Expression der *3xFlag-NOTCH2-ICD*. C) Die Regulation verschiedener Differenzierungsmarker wurde in 9 Tage alte Kulturen mittels quantitativer PCR ermittelt und relativ zur Leer-RCASBP-infizierten Kontrolle gesetzt. Hier sind sowohl chondrogene als auch osteogene Marker sind verglichen mit der Kontrolle herunterreguliert.

4.3 Vergleichende Analyse von Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsfaktor-Mutanten mittels ChIP-seq

Mittels ChIP-seq-Analysen können die genomweiten Bindestellen von Transkriptionsfaktoren verglichen werden. Dies kann hilfreich sein, um Konsequenzen auf die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren mit Mutationen zu untersuchen. Sowohl Mutationen in DNA- als auch Protein-bindenden Domänen können das Bindevverhalten von Transkriptionsfaktoren verändern. Für diese beiden Fälle sollte ein genomweiter Vergleich des Bindevhaltens von Transkriptionsfaktoren und deren mutierten Varianten mittels ChIP-seq durchgeführt werden. Dafür wurden drei humangenetisch relevante *missense*-Mutationen in der DNA-bindenden MSX2-Homöodomäne ausgewählt. Hierzu wurde die entsprechende Position des Hühnchen MSX2-Gens mutiert (Tabelle 4.4).

Desweiteren wurde der Effekt einer *missense*-Mutation in der Protein-interagierenden Twistbox von *TWIST2* untersucht. Für *TWIST2* wurde das Serin an Position 192 durch ein Prolin ersetzt. Die homologe Position des murinen Twist1 ist wichtig für die Protein-Protein-Interaktionen u.a. mit Runx2 (Abbildung 4.19). Aufgrund der hohen Konservierung zwischen Twist1 und Twist2, sowie der 100 %-igen Konservierung der Twistbox von Twist1 und Twist2 zwischen Maus und Huhn ist davon auszugehen dass die Funktion dieser Position konserviert ist. Die wildtypische Sequenzen von MSX2, *TWIST2* und die der mutierten Varianten wurden N-terminal mit der 3xFlag-Sequenz fusioniert und die kodierenden Sequenzen für die retroviral vermittelte Expression in Hühner-Micromasskulturen in den RCASBP-Virus kloniert.

Tabelle 4.4 Humane *missense*-Mutationen von MSX2 und ihre äquivalente Position im MSX2-Homolog von *Gallus gallus*. Angegeben sind jeweils die Positionen der mutierten Aminosäuren in der Homöodomäne und in Klammern die Position in der Proteinsequenz der jeweiligen Referenzsequenz.

Humangen. Erkrankung	<i>Homo sapiens</i> <i>MSX2</i> (NM_002449.4)		<i>Gallus gallus</i> <i>MSX2</i> (NM_204559.1)	
	Aminosäure	Nucleotid	Aminosäure	Nucleotid
Kraniosynostose (Boston-Typ)	P7H (P148H)	443 C>A	P7H (P140H)	419-420 CA>AC
Foramina parietalia	L13P (L154P)	461 T>C	L13P (L146P)	437 T>C
Foramina parietalia	R31H (R172H)	515 G>A	R31H (R164H)	491-492 GA>AT

Ergebnisse

1	MMQDVSSSPVSPADDSLNSNEEFDRQQPASGKRGARKRRSSRRSAGGSAGPGGATGGGI	60	Tw1_Mm
1	-MEESSSPVSPVDS-LGTSEEELERQPKRFGR---KRRYSKK-----	38	Tw2_Gg
	*.: *****_*. *_.***** :** *: *** *.:		
61	GGGDEPGSPAQKRGKKSAGGGGGGAGGGGGGGSSSSGGSPQS YEELQTORVMANVR	120	Tw1_Mm
39	--SSEDGSPNPGKRGKK-----SSPSSQSYEELQSQRILANVR	74	Tw2_Gg
	..* *** ***** .. * *****:***:***		
121	ERQRTQSLNEAFAALRKIIPTLPSDKLSKIQLKLAARYIDFLYQVLQSDELDSKMASCS	180	Tw1_Mm
75	ERQRTQSLNEAFAALRKIIPTLPSDKLSKIQLKLAARYIDFLYQVLQSDMDSKMTSCS	134	Tw2_Gg
	*****:***:***		
181	YVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH	206	Tw1_Mm
135	YVAHERLSYAFSVWRMEGAWSMSASH	160	Tw2_Gg

Abbildung 4.19 Vergleich des murinen Twist1 (NM_011658) und Twist2 (NM_204679) aus *Gallus gallus*. Die rote Umrandung markiert die Twistbox. Die Pfeilspitze zeigt das Serin an Position 192 des murinen Twist1 bzw. an Position 146 des TWIST2 aus *Gallus gallus*.

Vergleich der Aktivität von MSX2 und dessen Varianten am NOTCH2 Promotor

Es konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass MSX2 in der Lage ist, die NOTCH2-Promotorregion zu aktivieren (Abschnitt 4.2.4). Daher wurde die Auswirkung einer Expression der 3xFlag-MSX2-Varianten MSX2^{P7H}, MSX2^{L13P} und MSX2^{R31H} auf die klonierte NOTCH2-Promotorregion in einem Luziferase-Assay in CV-1 Zellen untersucht. Hier zeigte sich, dass MSX2^{P7H} die Luziferaseaktivität noch etwas stärker aktiviert als MSX2, während MSX2^{L13P} und MSX2^{R31H} die Luziferaseaktivität verglichen zur Kontrolle nur minimal steigern (Abbildung 4.20).

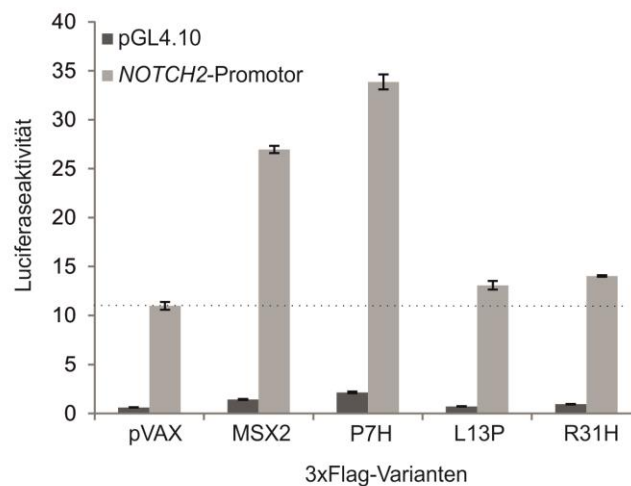


Abbildung 4.20 Luziferaseaktivität in CV1 Zellen nach Transfektion des NOTCH2-Promotors und 3xFlag-MSX2-Varianten als funktionaler Test der DNA-Bindung durch verschiedene MSX2-Mutationen. Im Vergleich zur Kontrolle (pVAX) aktivieren 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-MSX2^{P7H} die Luziferaseaktivität in Anwesenheit des NOTCH2-Promotors im Gegensatz zu 3xFlag-MSX2^{L13P} und 3xFlag-MSX2^{R31H}.

4.3.1 Überexpression der 3xFlag-MSX2-Varianten $MSX2^{P7H}$, $MSX2^{L13P}$ und $MSX2^{R31H}$ in Hühner-Micromasskulturen

Die Folgen der Expression der $MSX2$ -Varianten P7H, L13P und R31H im Vergleich zu $MSX2$ -Wildtyp in Hühner-Micromasskulturen wurde zunächst anhand von Alcian-Blau und ALP-Färbungen bewertet und für 9 Tage alte Kulturen hier abgebildet (Abbildung 4.21). In $3xFlag$ - $MSX2$ infizierten Kulturen zeigte sich deutlich die schon gezeigte Reduktion der Knorpelmatrix in der verringerten Alcian-Blau Färbung verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 4.21 A und B). In $3xFlag$ - $MSX2^{P7H}$ infizierten Kulturen war diese Reduktion noch stärker. Alcian-Blau gefärbte Knorpelmatrix ist kaum erkennbar (Abbildung 4.21 C). Im Gegensatz dazu ist die inhibitorische Wirkung auf die Chondrozytendifferenzierung in $3xFlag$ - $MSX2^{L13P}$ und $MSX2^{R31H}$ infizierten Kulturen aufgehoben. Die Alcian-Blau-Färbung zeigte eine vergleichbare Knorpelproduktion wie in der RCASBP-Kontrolle (Abbildung 4.21 D und E). In der ALP-Färbung zeigte sich eine sehr ähnliche Auswirkung auf die Differenzierung von potentiellen Osteoblastenvorläuferzellen (Abbildung 4.21 A'-E'): ALP-positive Zellen in der Peripherie sind in $3xFlag$ - $MSX2$ - und noch stärker in $3xFlag$ - $MSX2^{P7H}$ exprimierenden Kulturen reduziert. Die Expression von $3xFlag$ - $MSX2^{L13P}$ und $3xFlag$ - $MSX2^{R31H}$ führt zu keiner veränderten ALP-Färbung, verglichen mit der RCASBP-Kontrolle (Abbildung 4.21 D' und E').

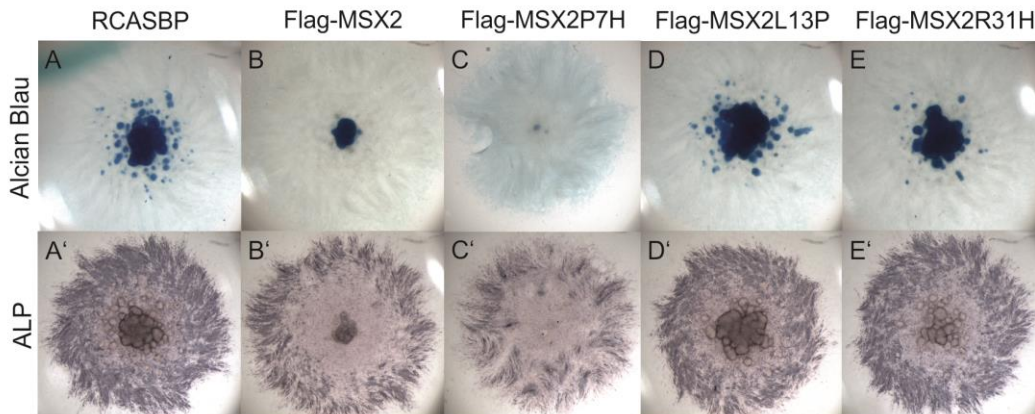


Abbildung 4.21 Histologische Färbungen von 9 Tage alten Hühner-Micromasskulturen nach Überexpression von $3xFlag$ - $MSX2$ und dessen Varianten P7H, L13P und R31H. A-E) Alcian-Blau-Färbung als Maß der chondrogenen Differenzierung. A'-E') ALP-Aktivitätsnachweis als Maß osteogener Aktivität. Die Expression von $3xFlag$ - $MSX2^{P7H}$ inhibiert die Differenzierung der Zellen noch stärker als der Wildtyp $3xFlag$ - $MSX2$. Diese Inhibition ist in $3xFlag$ - $MSX2^{L13P}$ und $3xFlag$ - $MSX2^{R31H}$ -infizierten Kulturen aufgehoben und ist vergleichbar mit den RCASBP-leer-infizierten Kontrollen.

4.3.2 Überexpression von 3xFlag-TWIST2 und 3xFlag-TWIST2^{S146P} in Hühner-Micromasskulturen

Der Vergleich der Expression von 3xFlag-Twist2 und 3xFlag-Twist2^{S146P} zeigte in der Alcian-Blau- und ALP-Färbungen 9 Tage alter Hühner-Micromasskulturen zunächst keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante. Beide inhibierten die Differenzierung der Kulturen im ähnlichen Maße. (Abbildung 4.22).

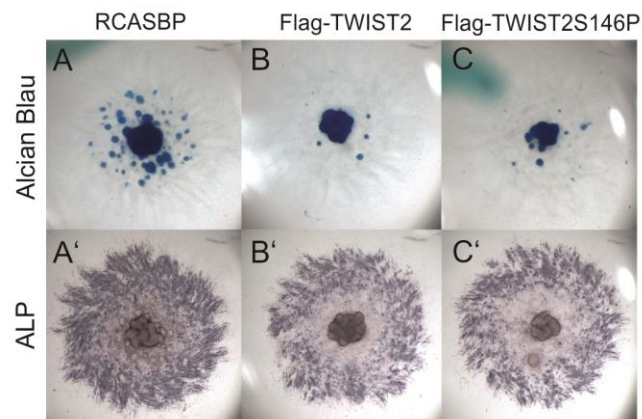


Abbildung 4.22 Histologische Färbung von 9 Tage alten Hühner Micromasskulturen nach Überexpression von Flag-TWIST2 und Flag-TWIST2^{S146P}. A-C) Alcian-Blau-Färbung als Maß der chondrogenen Differenzierung. A'-C') ALP-Aktivitätsnachweis als Maß osteogener Aktivität. Sowohl die Expression von 3xFlag-TWIST2 als auch die Mutante 3xFlag-TWIST2^{S146P} inhibieren die Differenzierung verglichen mit den RCASBP-leer-infizierten Kontrollen.

4.3.3 Genomweite Verteilung der Bindestellen

Für die Analysen des Bindevhaltens der mutierten 3xFlag-Transkriptionsfaktoren mittels ChIP-seq wurden zuerst die Anzahl der Bindestellen, sowie deren Verteilung im Genom ermittelt. Die Anzahl der ermittelten Bindestellen für alle hier eingesetzten Transkriptionsfaktoren ist in Tabelle 4.5 aufgeführt. Hier zeigte sich eine ähnliche Anzahl an Bindestellen für MSX2 (10.986 Peaks) und MSX2^{P7H} (11.137 Peaks). Die Anzahl der Bindestellen für MSX2^{L13P} und MSX2^{R31H} waren deutlich reduziert. Für MSX2^{L13P} sind es nur noch 5.553 Bindestellen und für MSX2^{R31H} 4.616 Bindestellen. Für TWIST2 und TWIST2^{S146P} konnten deutlich mehr Bindestellen detektiert werden. So waren es für den Wildtypen insgesamt 27.195 Bindestellen, und für die Mutante insgesamt 22.627 Bindestellen.

Um die Verteilung der Bindestellen der hier verwendeten Transkriptionsfaktoren zu analysieren, wurde dieselbe Klasseneinteilung des Genoms in „Promotor“, „Exon“, „Intron“, „Genflankierend“ und „intergenisch“ genutzt wie für RUNX2 und MSX2-Wildtyp (Abschnitt 4.2.2 und Abbildung 4.10) und die Anzahl der Bindestellen für jeden der Transkriptionsfaktoren in diesen Klassen ermittelt (Tabelle 4.6). Der prozentuale Anteil der Peaks in bestimmten Klassen

Tabelle 4.5 Anzahl der konsistenten Peaks in zwei Replikaten für verschiedene ChIP-seq-Experimente der 3xFlag-Transkriptionsfaktoren.

ChIP-seq Experimente [3xFlag]	Peaks (oberhalb einer IDR=0,01)
MSX2	10986
MSX2 ^{P7H}	11137
MSX2 ^{L13P}	5553
MSX2 ^{R31H}	4616
TWIST2	27195
TWIST2 ^{S146P}	22627

für eine Mutante wurde dann mit denen des Wildtyps verglichen. Da sich die Sequenzen der Klassen überschneiden können, übersteigt die Summe der Peaks in den genomischen Klassen die Gesamtanzahl der Peaks.

Für MSX2 und MSX2^{P7H} zeigte sich in dem Anteil der Peaks in Promotoren ein leichter Unterschied. Die P7H-Mutante hatte knapp 2 Prozentpunkte weniger Peaks in Promotoren als der MSX2-Wildtyp. Dies sind absolut gesehen ca. 200 Peaks Differenz. Insgesamt unterschied sich die Verteilung der Peaks jedoch nur wenig.

Die Anzahl der Peaks für MSX2^{L13P} zeigte einen starken Anstieg der Bindestellen in Promotoren. Der prozentuale Anteil der Promotor-Peaks an der Gesamtzahl der Peaks stieg auf ca. das Zweifache verglichen mit MSX2. Auch die Anteile von Peaks in Exonen stiegen für MSX2^{L13P} auf fast 6 Prozent, während die Bindestellen von MSX2 und MSX2^{P7H} in dieser Klasse nur einen Prozent der Gesamtbindestellen ausmachten. Auch Gen-flankierende Bereiche waren durch MSX2^{L13P} in Relation häufiger gebunden als durch MSX2. Dafür sank der Anteil der Peaks in Introns von ca. 37 Prozent auf knapp 23 Prozentpunkte verglichen mit MSX2. Die Verteilung der MSX2^{R31H}-Bindestellen ergab ein etwas anderes Ergebnis: Hier stieg der Anteil von Peaks in intergenischen Sequenzen auf ca. 42 Prozent und damit um ca. 13 Prozentpunkte mehr als bei MSX2. Wie bei MSX2^{L13P} wurden auch weniger Peaks in Introns gezählt. Die prozentuale Anzahl der Peaks in Promotoren sank ebenfalls, blieb für die von Exonen aber unverändert, verglichen mit MSX2.

Für die Verteilung der TWIST2 und TWIST2^{S146P} Bindestellen ergab der prozentuale Vergleich keine Unterschiede. RUNX2 bindet als einziger der hier untersuchten wildtypischen Transkriptionsfaktoren verstärkt in Promotoren, sowie in Gen-flankierenden Sequenzen. Dafür wurden verhältnismäßig weniger intergenische Bindestellen gezählt.

Tabelle 4.6 Prozentuale Verteilung von Peaks verschiedener ChIP-seq Experimente im Genom.

3xFlag-	Promotor		Exon		Intron		Gen-flankierend		intergenisch	
	%	Anzahl [peaks]	%	Anzahl [peaks]	%	Anzahl [peaks]	%	Anzahl [peaks]	%	Anzahl [peaks]
MSX2	14,1	1553	1,0	111	37,3	4099	42,6	4685	28,5	3131
MSX2 ^{P7H}	12,3	1367	1,0	110	38,7	4314	41,0	4656	29,1	3246
MSX2 ^{L13P}	32,9	1829	5,6	313	22,7	1260	56,7	3147	25,0	1388
MSX2 ^{R31H}	11,4	526	1,4	63	26,2	1211	36,9	1701	41,9	1934
TWIST2	13,4	3647	1,2	318	37,7	10256	42,8	11629	28,5	7741
TWIST2 ^{S146P}	13,2	2994	1,1	241	38,0	8591	42,4	9596	28,6	6477
RUNX2	19,8	2487	1,5	183	35,7	4482	49,8	6240	22,3	2802
Anteil am Genom	12,0		2,1		32,2		37,6		36,8	

4.3.4 Vergleiche der genomweiten Bindestellen zwischen Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsfaktor-Mutanten

Für die hier analysierten Transkriptionsfaktoren und deren Mutanten stellt sich die Frage ob und wie viele gemeinsame und verschiedene Bindestellen sich ermitteln lassen. Um dies zu untersuchen wurden die den Peaks zugeordneten Sequenzen von Wildtyp und Mutante verglichen und die Anzahl der geteilten und individuellen Peaks bestimmt (Abbildung 4.23, sowie Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8). So finden sich ca. 70 Prozent der MSX2^{P7H} gebundenen Regionen auch unter denen von MSX2^{WT}. Nur 1.260 der von MSX2^{L13P} gebundenen Regionen werden auch durch MSX2^{WT} gebunden. Dies entspricht ca. einem Viertel der gesamten L13P-Peaks. Für MSX2^{R31H} und MSX2 gibt es eine Schnittmenge von 727 Peaks und entspricht ca. einem Sechstel der R31H-Peaks.

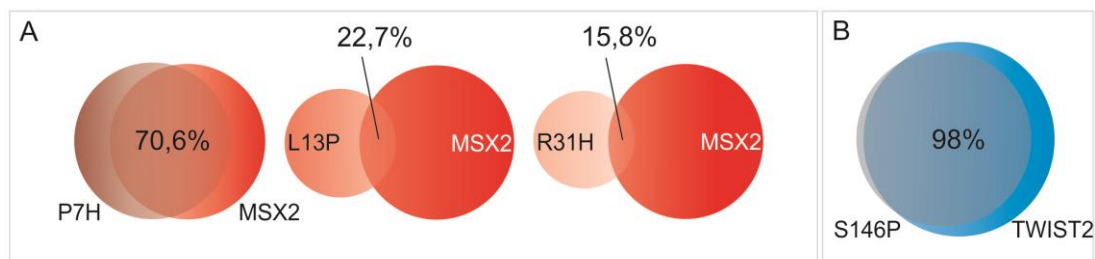


Abbildung 4.23 Anteil der geteilten Peaks zwischen Mutanten und Wildtypen, visualisiert in Venn-Diagrammen. 70,6% der MSX2^{P7H}-Peaks finden sich auch bei MSX2^{WT}. MSX2^{L13P} teilt sich 22,7% der Peaks mit MSX2^{WT} und für MSX2^{R31H} sind es 15,8% geteilte Peaks mit MSX2^{WT}. Hingegen überlappen 98% der Peaks für TWIST2^{S146P} mit den Peaks für TWIST2^{WT}. Die zugehörigen Zahlen befinden sich in Tabelle 4.7 und Tabelle 4.8.

Die Schnittmengen zwischen TWIST2 und TWIST2^{S146P} Bindestellen beträgt 22.152 Bindestellen. Dies entspricht ca. 98 Prozent aller TWIST2^{S146P} Bindestellen. Damit verbleiben für TWIST2^{S146P} eine Anzahl von nur 475 individuellen Bindestellen und für TWIST2 4.568 individuelle Bindestellen, da TWIST2^{WT} insgesamt mehr Bindestellen hat als die Mutante.

Tabelle 4.7 Anteil der gemeinsamen und individuellen Peaks von 3xFlag-MSX2 und den untersuchten 3xFlag-Mutationen.

	Msx2	P7H	L13P	R31H
gesamt	10986	11137	5553	4616
individuell	-	3280	4293	3889
geteilt mit MSX2	10986	7857	1260	727
geteilt [%]	100 %	70,6 %	22,7 %	15,8%

Tabelle 4.8 Anteil der gemeinsamen und individuellen Peaks zwischen 3xFlag-TWIST2 und 3xFlag-TWIST2^{S146P}.

	Twist2	S146P
gesamt	27195	22627
individuell	-	475
geteilt mit TWIST2	27195	22152
geteilt [%]	100 %	98%

4.3.5 Motivanalysen

Für alle Motivanalysen wurden 150 bp langen Sequenzen um den Peak-*summit*, also die Position mit der höchsten Fragmentanreicherung, verwendet. Dies ist der wahrscheinlichste Ort der Transkriptionsfaktor-DNA-Interaktion ist. Um die Häufigkeit der ermittelten Motive vergleichen zu können, wurde immer die gleiche Anzahl der stärksten Peaks gewählt.

Vergleichende Motivanalyse von 3xFlag-MSX2 und dessen L13P- und R31H-Varianten

Um herauszufinden, ob die Varianten von MSX2 aufgrund ihrer Mutationen in der DNA-bindenden Homöodomäne andere Motive bevorzugen, wurden zunächst die 1.000 stärksten Peaks für eine Motivanalyse mit DREME verwendet (Abbildung 4.24). Falls die Mutationen zu einer veränderten Sequenzspezifität der DNA-Bindung durch die Homöodomäne führen, sollte sich dieses in den am stärksten gebundenen Bindestellen widerspiegeln.

In den von MSX2^{L13P} gebundenen Sequenzen wurde keines der in den MSX2^{WT}-Peaks gefundenen Motive angereichert. Dagegen scheinen bevorzugt GC-reiche Motive gebunden zu werden (Abbildung 4.24 C). Wenn man die ermittelten E-Werte vergleicht, ist erkennbar, dass die ersten beiden Motive wesentlich stärker repräsentiert sind, als die Motive der MSX2^{WT}-Analyse. Aufgrund der drastischen Veränderung der Motive in den von 3xFlag-MSX2^{L13P} gebundenen Sequenzen und der großen Anzahl von Peaks in Promotorregionen (siehe Absatz 4.3.3) wurde mit den stärksten 1.000 Peaks noch einmal die genomweite Verteilung berechnet und zur Verteilung der stärksten 1.000 Peaks der 3xFlag-MSX2-ChIP-seq verglichen. Auch hier zeigte sich, dass die L13P-Variante häufiger in Promotoren bindet (Abbildung 4.25). Wie auch zuvor ergibt sich hier eine Steigerung auf 32 Prozentpunkte im Gegensatz zu MSX2, welches lediglich mit 15 Prozent der Peaks in Promotoren liegt. Auch der erhöhte Anteil von Peaks in Exonen bestätigt sich für die stärksten 1.000 Peaks. Die Motivanalyse für die R31H-Variante ergab keine überrepräsentierte Sequenz (Abbildung 4.24 D).

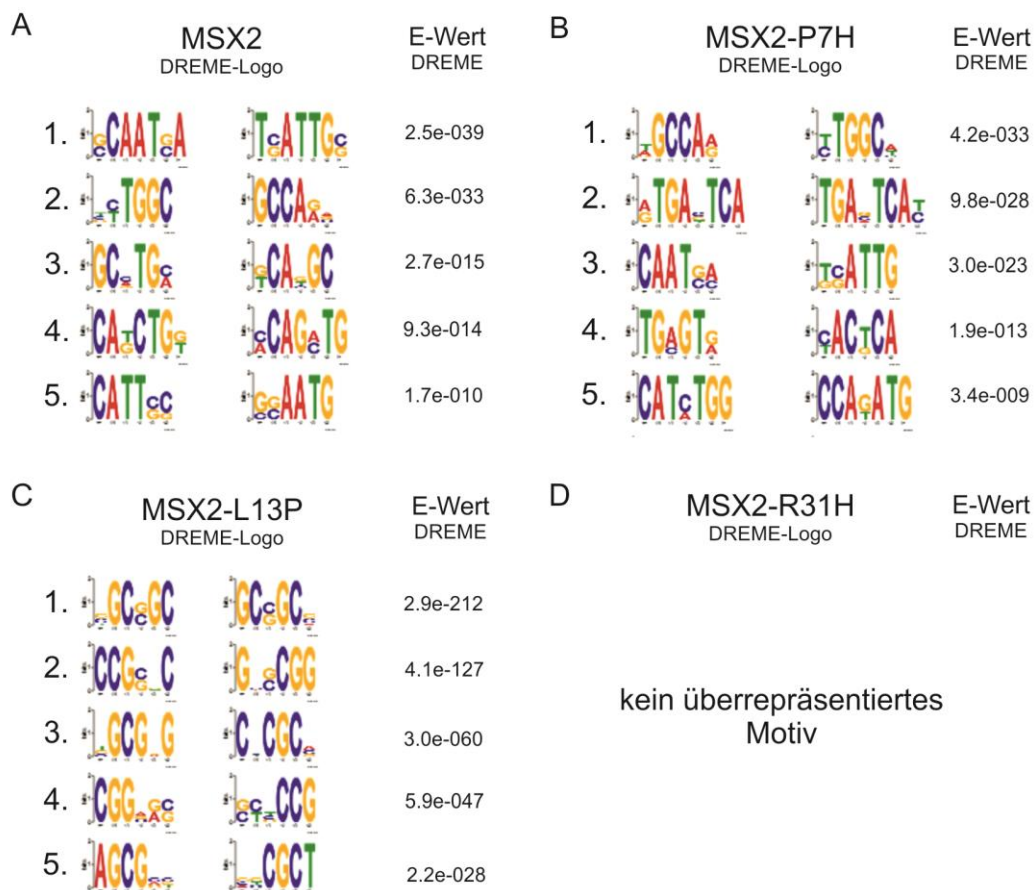


Abbildung 4.24 Motivanalyse mit DREME. Für die Motivanalysen wurden die 1.000 stärksten Peaks aus den ChIP-seq Analysen für 3xFlag-MSX2 (A), 3xFlag-MSX2^{P7H} (B), 3xFlag-MSX2^{L13P} (C) und 3xFlag-MSX2^{R31H} verwendet (D). Es wurden die ersten fünf Motive, geordnet nach steigenden E-Werten der DREME-Analyse dargestellt.

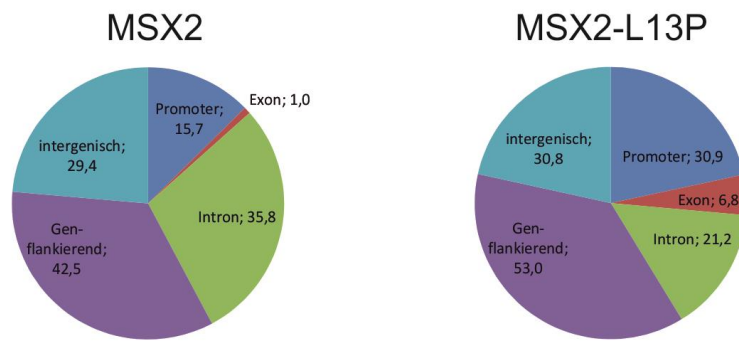


Abbildung 4.25 Prozentuale Verteilung der 1.000 stärksten Peaks aus den ChIP-seq Analysen für 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-MSX2^{L13P}. Die Verteilung der Peaks bezieht sich auf die Klassen „Promotor“ (dunkelblau), „Exon“ (rot), „Intron“ (grün), „Genflankierend (lila)“ und „Intergenisch“ (helblau). Unter den 1.000 stärksten Peaks der 3xFlag-MSX2^{L13P}-ChIP-seq verteilen sich deutlich mehr Peaks in den Klassen „Promotor“ und „Exon“.

Vergleich der Motivanalysen von 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-MSX2^{P7H}

In den Sequenzen der 1.000 stärksten Peaks der MSX2^{P7H}-Mutante werden ähnliche Motive gefunden, wie in denen von MSX2^{WT}, allerdings mit veränderten E-Werten (Abbildung 4.24). Das häufigste MSX2^{WT}-Motiv (GCSAR) ist nur das dritthäufigste unter den MSX2^{P7H}-Motiven. Das zweithäufigste Motiv in MSX2^{WT}-Peaks war dafür häufiger in den 1.000 stärksten Peaks der P7H-Mutante vertreten. Um diese Beobachtung einer veränderten Motivpräferenz zu überprüfen, wurde erneut eine Motivanalyse für MSX2^{WT} und MSX2^{P7H} gebundene Sequenzen durchgeführt. Diesmal wurden die Sequenzen der 5.000 stärksten Peaks beider Datensätze verwendet (Abbildung 4.26). Dies entspricht ca. der Hälfte aller Peaks für MSX2^{WT} und MSX2^{P7H}. Der Vergleich der ermittelten E-Werte für ähnliche Motive zeigte auch hier Unterschiede für die Wahrscheinlichkeit von Motiven. Das stärkste Motiv in MSX2^{WT}-gebundenen Sequenzen hat die Sequenz GCSAR. Das stärkste Motiv in MSX2^{P7H}-gebundenen Sequenzen (TGABTCAB) ist nur das drittstärkste in MSX2^{WT}-gebundenen Sequenzen (vergleiche Abbildung 4.26 MSX2 und P7H).

Da sich die Motive allerdings leicht unterscheiden und somit deren hier gezeigten Häufigkeiten nicht direkt vergleichbar sind, wurde für einen genaueren Vergleich der Motivanalysen die absolute Häufigkeit der vier stärksten MSX2-Motive in den Top 5.000 Peaks von MSX2 und MSX2^{P7H} verglichen (Abbildung 4.27). Die in MSX2-Peaks angereicherten Motive GCASR, CAATSAR und das Runx-Motiv TGTGGY waren verglichen zum Wildtyp weniger oft in der Mutante vertreten. Dafür war das Motiv TGAVTCAB stärker in P7H-Peaks vertreten.









MSX2 überrepräsentierte Motive		E-Wert DREME	MSX2-P7H überrepräsentierte Motive		E-Wert DREME
IUPAC-Code	DREME-Logo		IUPAC-Code	DREME-Logo	
1. GCSAR		8.5e-168	TGABTCAB		2.8e-168
2. CAATSAR		9.7e-103	WGCCAR		4.9e-150
3. TGAVTCAB		4.0e-069	SCAATSA		1.7e-065
4. TGTGGY		1.8e-044	WGTGGTT		3.9e-034

Abbildung 4.26 Gezeigt sind die überrepräsentierten Motive in den 5.000 stärksten Peaks aus der 3xFlag-MSX2 (MSX2) und 3xFlag-MSX2^{P7H} (MSX2-P7H) ChIP-seq. Der E-Wert ist der von DREME für diese Analyse berechnete Wahrscheinlichkeitswert. Die Motive sind nach sinkender Wahrscheinlichkeit sortiert.





MSX2 überrepräsentierte Motive		Anzahl von Peaks mit Motiv		Differenz
IUPAC-Code	DREME-Logo	MSX2	P7H	
1. GCSAR		2723	2218	505
2. CAATSAR		613	478	135
3. TGAVTCAB		586	914	-328
4. TGTGGY		1193	957	236

Abbildung 4.27 Vergleich der Anzahl von Peaks mit den vier stärksten Motiven der 3xFlag-MSX2-ChIP-seq Motivanalyse. Einbezogen sind nur die 5.000 stärksten Peaks der 3xFlag-MSX2 und 3xFlagMSX2^{P7H} ChIP-seq und auf 150 bp um den Peak-*summit* begrenzt. Dann wurden alle 150 bp-Sequenzen gezählt, die das jeweilige MSX2-Motiv mindestens einmal enthielten. Es zeigen sich unterschiedliche Anzahlen für MSX2 und MSX2^{P7H}. Motiv 1, 2 und 4 ist häufiger unter den MSX2-Sequenzen vertreten, während Motiv 3 häufiger in MSX2^{P7H} vertreten ist.

Die vier stärksten MSX2-Motive wurden anhand der Jaspar-Datenbank „Core Vertebrate“ mit bereits bekannten Motiven von Transkriptionsfaktoren in Vertebraten verglichen, um mögliche Faktoren zu finden, die diese Motive binden (Abbildung 4.28). Es wurden immer die zwei ersten Treffer mit den höchsten p-Werten aufgeführt. Das GCSAR Motiv ist stark ähnlich zu den Konsens-Motiven der Transkriptionsfaktoren E2F1 und *Nuclear factor IA* (NFIA).

Das CAATSAR Motiv hatte am stärksten Ähnlichkeit mit denen des *Nuclear transcription factor Y subunit alpha* (NFYA) und dem Homeobox-Transkriptionsfaktor *Pre-B-cell leukemia transcription factor 1* (PBX1). Das vierte Motiv TGTGGY ist wie bereits erwähnt das Runx-Konsensmotiv und war das Motiv mit der stärksten Ähnlichkeit, gefolgt von dem Konsens-Motiv des *Krüppel-like factor 4*.

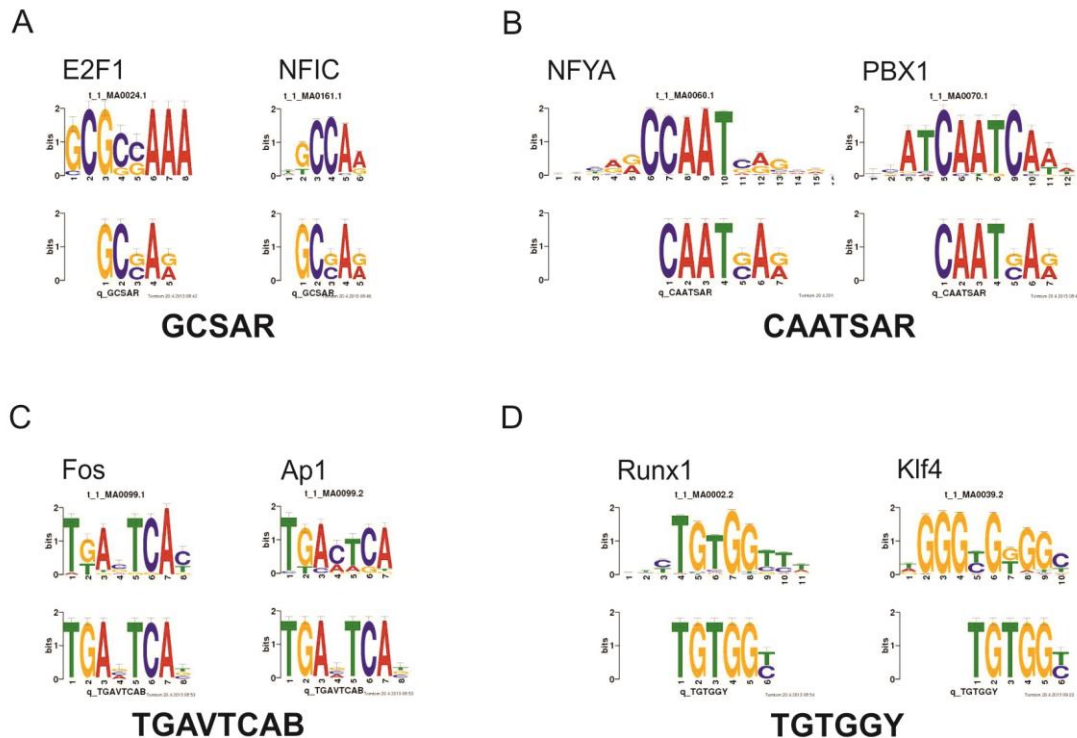


Abbildung 4.28 Vergleich der in 3xFlag-MSX2-Peaks überrepräsentierten Motive mit bekannten Konsens-Motiven. Die vier stärksten Motive in 3xFlag-MSX2-Peaks GCSAR (A), CAATSAR (B), TGAVTCAB (C) und TGTGGY (D) wurden mit Hilfe des MEME-Tools TOMTOM mit denen in der JASPAR-core-Vertebrate-Datenbank enthaltenen Motiven verglichen. Die zwei Motive mit der stärksten Ähnlichkeit (hier jeweils das obere Motiv) wurden zusammen mit dem jeweiligen in 3xFlag-MSX2-Peaks enthaltenen Motiven (hier jeweils untere Motiv) dargestellt.

Ansatz zur Untersuchung der MSX2-DNA-Bindung mit dem potentiellen Kofaktoren RUNX2

Die Anreicherung des Runx-Konsensmotivs in den von MSX2-gebundenen Sequenzen könnte auf eine Protein-Protein-Interaktion von MSX2 mit RUNX2 zurückzuführen sein, so dass MSX2 die DNA nur indirekt über die Interaktin zu RUNX2 bindet. Um dies zu testen, wurden Hühner-Micromasskulturen ko-infiziert, die dann sowohl *3xFlag-MSX2* exprimieren als auch *RUNX2* bzw. eine DNA-bindedefiziente Variante von *RUNX2* (Q209R), die beide kein Flag-Epitop tragen. Bei einer Chromatin-Immunpräzipitation unter Verwendung eines anti-Flag-Antikörpers, wird so nur MSX2 präzipitiert. Sollte eine Bindung zwischen MSX2 und RUNX2 erforderlich sein, damit MSX2 vermehrt an Sequenzen bindet, die ein Runx-Motiv enthalten, sollte in den Sequenzen einer anti-Flag-ChIP-seq aus *3xFlag-MSX2/RUNX2^{WT}* exprimierenden Zellen ein Runx-Motiv bevorzugt auftreten. In den Sequenzen einer anti-Flag-ChIP-seq aus *3xFlag-MSX2/RUNX2^{Q209R}}* exprimierenden Zellen würde dieses Motiv im Vergleich unterrepräsentiert sein. Da auch die Motivanalyse der *3xFlag-MSX2^{P7H}}*-Mutante das Runx-

Motiv zeigte, wurde das gleiche Experiment auch für diese Mutation durchgeführt. Bis zum Zeitpunkt der Fertigstellung dieser Arbeit konnten nur ChIP-seq-Experimente von Chromatin aus *3xFlag-MSX2^{P7H}* und *RUNX2* koexprimierenden Hühner-Micromasskulturen (*3xFlag-MSX2^{P7H}/Rx2-ChIP*) zusammen mit der zugehörige Kontrolle (nur *3xFlag-MSX2^{P7H}*) ausgewertet werden. Da Replikate der Experimente noch fehlen, konnte keine Anzahl von konsistenten Peaks bestimmt werden.

Daher wurden nur die 5000 stärksten Peaks beider ChIP-seq-Datensätze verglichen. Dafür wurde für die *3xFlag-MSX2^{P7H}/RUNX2-ChIP* eine Motivanalyse durchgeführt, bei der wiederum die 150 bp um den Peak-*summit* auf überrepräsentierte Sequenzen untersucht wurden. Das stärkste Motiv in diesen Sequenzen ist das Runx-Konsensmotiv (TGYGGY), gefolgt von dem bereits beobachteten Motiv CAATSAR (Abbildung 4.30 A). Da dies noch nicht bedeutet, dass *MSX2* und *RUNX2* gemeinsam an die DNA binden wurde der Abstand zwischen dem veröffentlichten *Msx*-Konsensmotiv YAATT und dem Runx-Motiv analysiert. Dafür wurde unter den 5.000 stärksten Peaks der *3xFlag-MSX2^{P7H}/RUNX2-ChIP* das *Msx*-Konsensmotiv (YAATT) ermittelt und die Sequenzen dann auf 250 bp zu beiden Seiten verlängert, so dass das *Msx*-Konsensmotiv immer im Zentrum der Sequenzen liegt (siehe dazu auch Abbildung 4.29). Dasselbe wurde für die Kontrolle durchgeführt. Dann wurden die relativen Anreicherungen von Motiven im Zentrum des Peaks mit Hilfe des Programms CentriMo ermittelt zusammen mit den Wahrscheinlichkeiten einer Anreicherung entlang der Sequenzen (Abbildung 4.30 B). Es wurden nur Motive ermittelt, die in der Jaspar-Databank „Core Vertebrate“ hinterlegt sind. Im Zentrum der Sequenzen wurden viele verschiedene Homöobox-Motive erkannt.

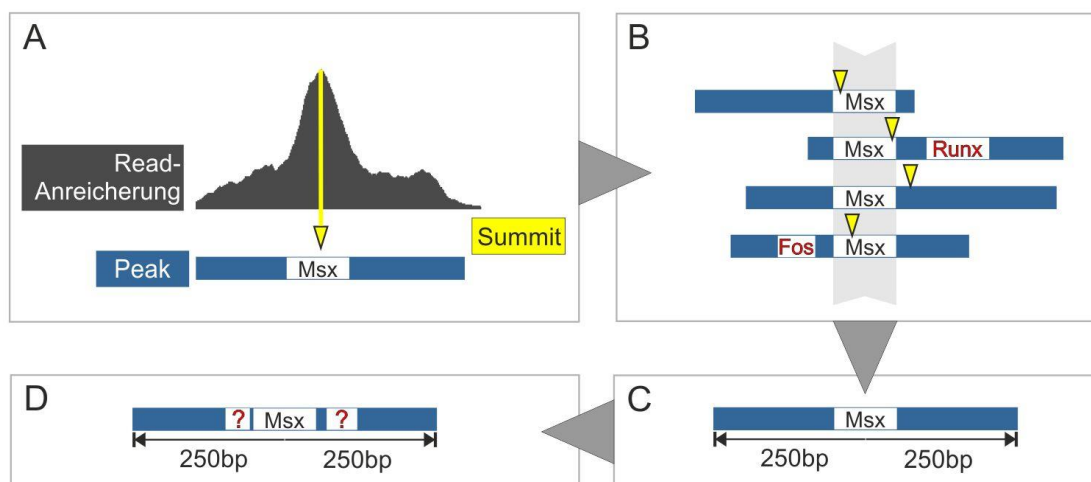


Abbildung 4.29 Schematische Darstellung der CentriMo-Analysen am Beispiel der MSX2-Peaks: A) Ermittlung der signifikanten Peaks mit den zugehörigen Summits. B) Ermittlung eines *Msx2*-Konsensmotivs in einem 50 bp Radius um den Summit. C) Zentrierung des *Msx2*-Motivs durch die Verlängerung des Motivs um jeweils 250 bp stromaufwärts und -abwärts. D) Einfütterung der 500 bp Sequenzen in CentriMo zur Identifizierung zentral angereicherter Motive.

Da das Msx-Motiv in der Jaspardatenbank „Core-Vertebrate“ nicht enthalten ist, wurde das Nobox-Konsensmotiv hier stellvertretend angegeben, um die Position und Anreicherung eines Msx2-typischen Homöobox-Motivs zu markieren. Deutlich ist erkennbar, dass die Anzahl von Runx-Motiven innerhalb von 50 bp um das zentrale Homöobox-Motiv ansteigt.

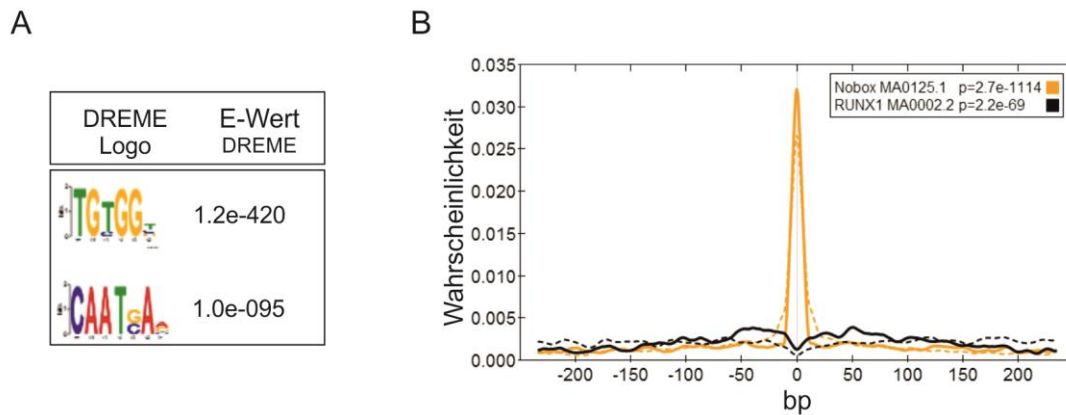


Abbildung 4.30 Motivanalysen von 3xFlag-MSX2^{P7H} und RUNX2 koexprimierenden Hühner-Micromasskulturen. A) DREME-Motivanalyse der 5000 stärksten Peaks der 3xFlag-MSX2^{P7H}/Runx2-coChIP. B) Anreicherung des Runx-Konsens-Motivs (schwarze Linie) relativ zu einem Homöobox-Motiv, wie es auch von MSX-Proteinen gebunden wird. (gelbe Linie, Nobox-Motiv). Die durchgezogenen Linien beschreiben die Wahrscheinlichkeiten der Motivanreicherung in ko-infizierten Kulturen im Vergleich zu den gestrichelten Linien, als Wahrscheinlichkeiten der Motivanreicherungen in MSX2^{P7H}-infizierten Kulturen, die nicht mit RUNX2 infiziert waren.

Ansatz zur weiteren Untersuchungen der RUNX2-DNA-Interaktion

Die Expression von 3xFlag-RUNX2 führte in der Analyse der ChIP-seq-Daten zur Identifizierung von 12.359 gebundenen Regionen. Da für Runx2 viele Interaktionspartner bekannt sind, die die Auswahl der von Runx2 gebundenen Regionen beeinflussen könnten, ist auch hier die Untersuchung einer Mutation in einer Protein-interagierenden Domäne von Runx2 hilfreich. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Mutante von RUNX2 aus *Gallus gallus* generiert, der das nukleäre Matrix-Targeting-Signal (NMTS) fehlt (RUNX2^{deltaNMTS}) und in einer Protein-Interaktionsdomäne von RUNX2 liegt. Die erste funktionelle Analyse von RUNX2^{deltaNMTS} in Luziferaseassays zeigte, dass die DNA-Bindung wahrscheinlich nicht beeinflusst ist, da sie in der Lage war, den *Indian hedgehog* Promotor ebenso wie der RUNX2-Wildtyp zu binden und zu aktivieren. (Abbildung 4.31).

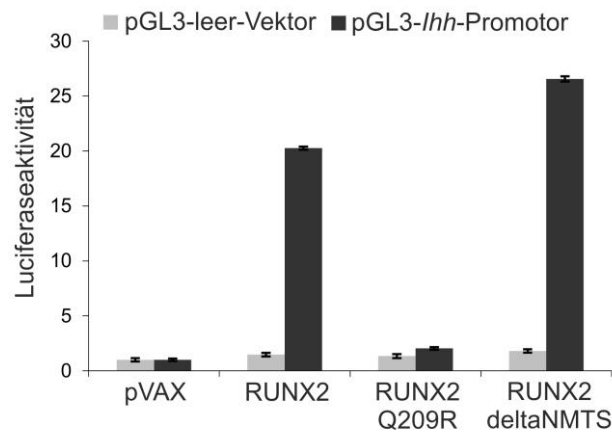


Abbildung 4.31 Regulation des *Indian Hedgehog* (*Ihh*) Promotorelements durch RUNX2-Varianten in Reporter-Assay. Dieser zeigt, dass im Gegensatz zu der DNA-binde-defizienten Runx2-Mutante Q209R die Deletion des *nuclear-matrix-targeting-signals* (deltaNMTS) die Luziferaseaktivität durch das Vorhandensein des *Ihh*-Promotoros aktiviert.

Motifanalysen von $TWIST2^{WT}$ und dessen Mutante $TWIST2^{S146P}$

Für die Bestimmung der überrepräsentierten Motive unter den $TWIST2^{WT}$ und $TWIST2^{S146P}$ Peaks wurden die stärksten 12.500 Peaks beider Datensätze verglichen. Dies entspricht in etwa der Hälfte der Peaks oberhalb einer IDR von 0.01. Es ergab sich sowohl in der Häufigkeit der auftretenden Motive, als auch in den Sequenzen der Motive keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 4.32 A). Sowohl in den von $TWIST2^{WT}$, als auch in den $TWIST2^{S146P}$ gebundenen Regionen wird am häufigsten ein Motiv mit der Sequenzfolge CA(G|T)(C|A)TG ermittelt. Die ersten beiden Motive entsprechen dem von Twist-Proteinen gebundenen E-Box-Motiv CANNTG. Das dritthäufigste Motiv wurde mit den Motiven der Jaspar-Datenbank „*Core-Vertebrate*“ verglichen. Die zwei besten Hits wurden in Abbildung 4.32 B dargestellt. Das Motiv DGCCAR hatte die stärkste Ähnlichkeit mit dem des Transkriptionsfaktors *Nuclear factor IC* und einem Motiv, welches von dem Heterodimer der beiden Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren Hand1 und Tcfe2a erkannt wird.

Da die Mutation S146P in einer Protein-Interaktionsdomäne von $TWIST2$ liegt und die Interaktion zu anderen Kofaktoren beeinflussen könnte, wurden die Sequenzen in unmittelbarer Nähe des Twist-Motivs CANNTG in den Top 5.000 Peaks analysiert. Da die Bindung eines Transkriptionsfaktors am wahrscheinlichsten an der Position mit der höchsten Sequenzanreicherung eines Peaks stattfindet (*summit*), wurde in einem Radius von 10 bp um diesen *summit* das CANNTG ermittelt und dieses dann auf einen Radius von 250 bp vergrößert. Unter den 5.000 stärksten Peaks für $TWIST2^{WT}$ wurden 4.850 Sequenzen mit einem CANNTG Motiv gezählt, und für $TWIST2^{S146P}$ 4.574 Sequenzen. Diese Sequenzen wurden mithilfe des Programms CentriMo analysiert. CentriMo vergleicht die Anzahl von bekannten Motiven, die

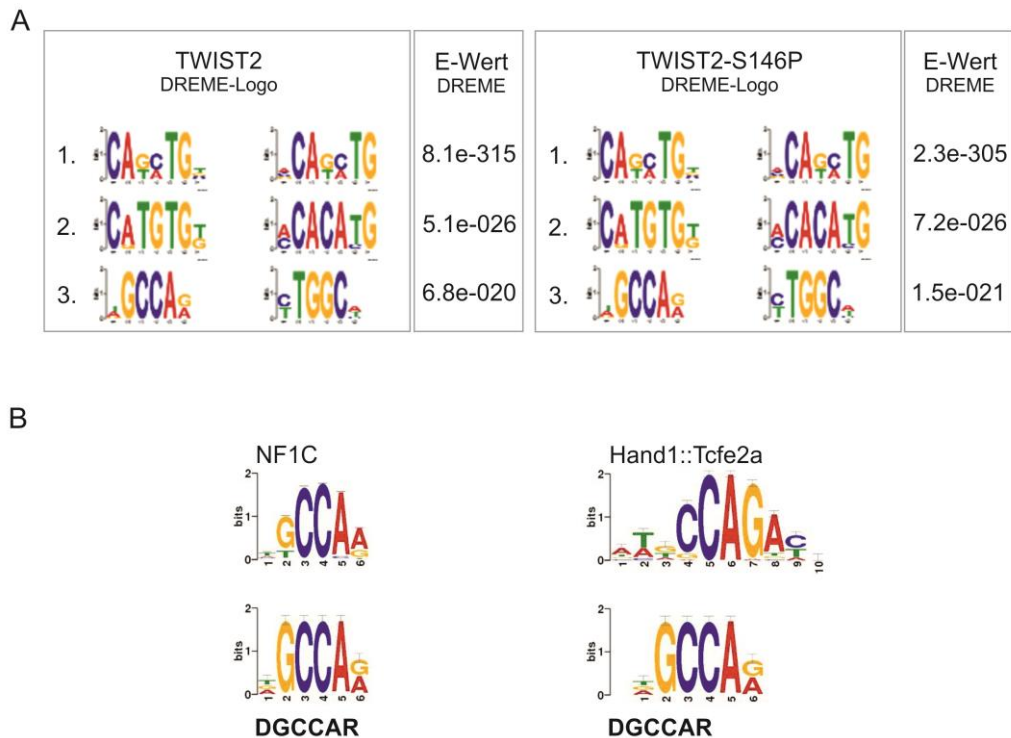


Abbildung 4.32 Motivanalysen der 3xFlag- TWIST2^{WT} und 3xFlag-TIWIST2^{S146P} gebundener Regionen. A) Die überrepräsentierten Motive wurden für 150 bp Sequenzen um den Peak-*summit* der 12500 stärksten Peaks ermittelt. Gezeigt sind die von DREME erstellten Motiv-Logos und E-Werte. Die ersten beiden Motive entsprechen dem von TWIST2^{WT} gebundenen E-Box Motiv CANNTG. Das dritte Motiv DGCCAR wurde mithilfe des Programms TOMTOM mit bekannten Motiven in der Jaspas-Datenbank „Core-Vertebrate“ verglichen (B). Die zwei ähnlichsten Motive werden von dem Transkriptionsfaktor NF1C bzw. dem Heterodimer Hand1::Tcf2a erkannt (B oben) und wurden zusammen mit dem Motiv DGCCAR aus der TWIST2^{WT}-Motivanalyse (B unten) abgebildet.

es im Zentrum einer gegebenen Sequenz findet mit einer erwarteten Frequenz dieses Motivs, wenn es unspezifisch angereichert wäre. Dadurch werden Motive ermittelt, die sich im Zentrum, also in diesem Fall in der Nähe des Twist-Motivs signifikant häufen. Diese Motive könnten zu möglichen Kofaktoren gehören. Ermittelt wurden von CentriMo Motive aus der Jaspas-Datenbank „Core Vertebrate“. Das im Zentrum häufigste Motiv war das Motiv des Heterodimers Tal1 und TCF3 und enthält das E-Box-Motiv (Abbildung 4.33, gelbe Linie in A und gelbe Box in C). Da die Jaspas-Core-Vertebrate-Datenbank ein Twist-Motiv nicht enthält, ist davon auszugehen, dass dieses Motiv das zentrierte CANNTG-Motiv ist und damit die TWIST2-Bindung widerspiegelt. Es wurde unter den Ergebnissen nach Motiven gesucht, die eine spezifische Häufung im Umkreis des Zentrums (also dem Twist-Motiv) zeigen.

Die stärksten Motive, die dieses Kriterium in den 3xFlag- TWIST2^{WT} -Sequenzen erfüllten waren Motive, die durch den Transkriptionsfaktor Foxo3 sowie die Homöobox-Transkriptionsfaktoren Pdx1 und Prrx2 erkannt werden (Abbildung 4.33 A und C).

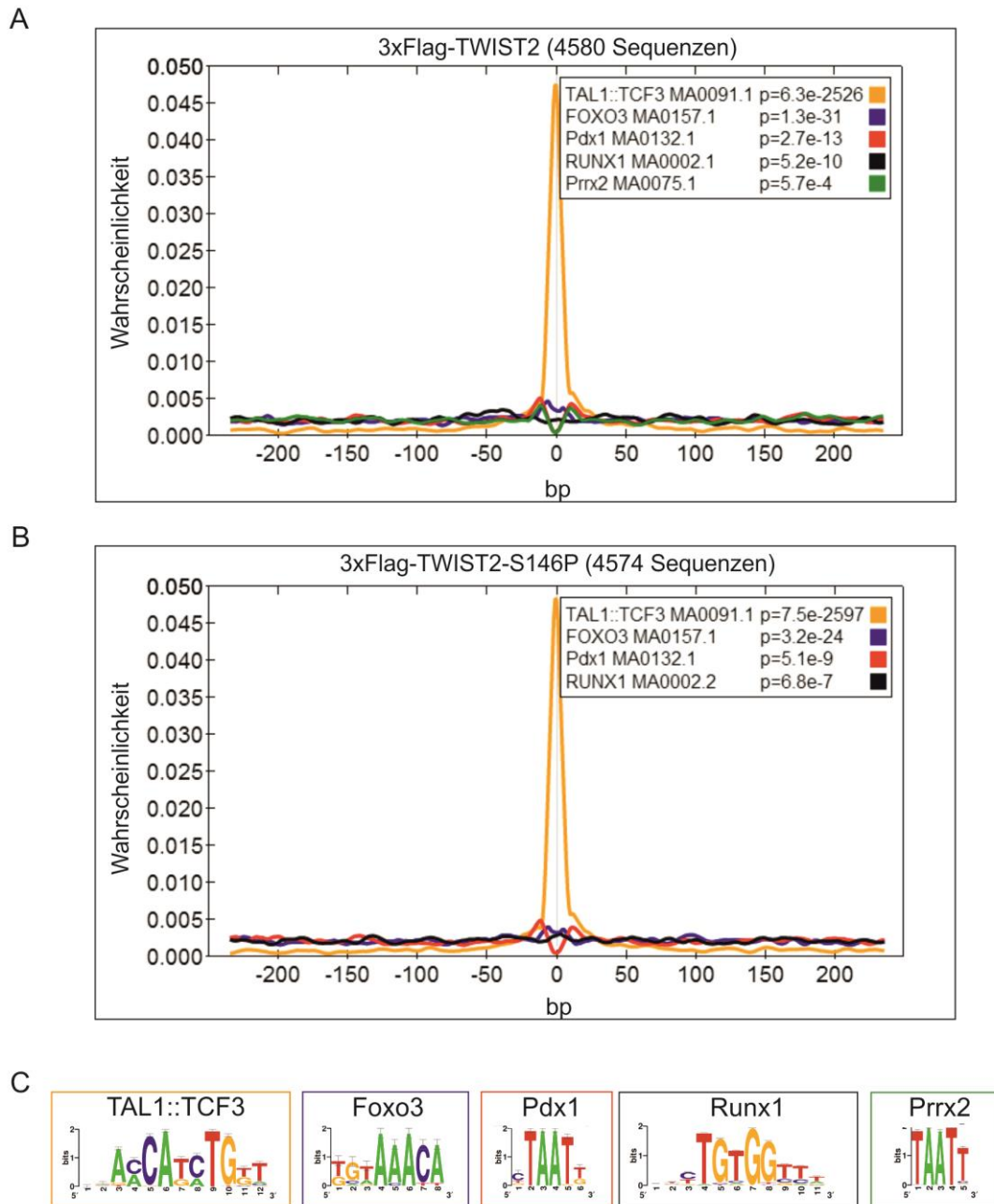


Abbildung 4.33 Motivanalysen mit CentriMo von 3xFlag-TWIST2 und 3xFlag-TWIST^{S146P} gebundenen Regionen. Wahrscheinlichkeiten für verschiedene Motive mit lokaler Anreicherung in der Nähe des Twist-Motiv CANNTG (Position 0 auf der x-Achse) für TWIST2 (A) und Twist2^{S146P} (B) gebundene Regionen. C) Sequenzen der ermittelten Motive und den Transkriptionsfaktoren, die sie binden.

Für 3xFlag-TWIST2^{S146P} war das Ergebnis ähnlich, allerdings erschien unter diesen nicht das Motiv des Transkriptionsfaktors Prrx2 (vergleiche grüne Linie in Abbildung 4.33 A mit B). Das Runx-Konsensmotiv war auch unter den Ergebnissen für TWIST2^{WT} und TWIST2^{S146P}, jedoch gab es keine maximale Anreicherung unmittelbar um das zentrale E-Box-Motiv wie sie bei den oben genannten Motiven zu beobachten war (Abbildung 4.33), sondern eine schwache

Anreicherung in einem ca. 50 bp-Radius um das E-Box-Motiv (Abbildung 4.33, schwarze Linie und Box).

Da sich die Mutation S146P in einer Protein-Interaktionsdomäne von TWIST2 befindet, könnte es sein, dass die hier ermittelten Kofaktor-Motive sich in der Häufigkeit in den von Wildtyp und Mutante gebundenen Sequenzen unterscheiden, etwa durch eine geschwächte Interaktion der Mutante zu RUNX2. Um dies Herauszufinden, wurde die CentriMo-Analyse etwas verändert wiederholt: Dieses Mal wurden die zentral auftretenden Motive in den TWIST2^{WT}-Peaks nicht gegen eine erwartete Anzahl verglichen, sondern relativ zu der Wahrscheinlichkeit derselben Motive in den Peaks der TWIST2^{S146P} Mutante (Abbildung 4.34 und Tabelle 4.9).

Das Motiv welches sich in seiner Häufigkeit im Zentrum des Peaks am deutlichsten in beiden Datensätzen unterschied, war das Runx-Konsensmotiv. Dieses war in einem Radius von 90 bp um das Zentrum, und mit einem Maximum bei etwa -30 bp, häufiger in den TWIST2^{WT} als in den TWIST2^{S146P} Peaks (1.412-mal in TWIST2^{WT} und 1.281-mal in TWIST2^{S146P} Sequenzen). Als Vergleich sind noch die Motive von Prrx2, Pdx1 und Foxo3 dargestellt, deren absolute Häufigkeit in den Sequenzen insgesamt geringer ist (Tabelle 4.9) und sich in den TWIST2^{WT} und TWIST2^{S146P} Sequenzen kaum unterschieden. In der Tabelle 4.8 sind die Ergebnisse der Analyse numerisch aufgeführt.

Die p-Werte wurden aus der relativen Wahrscheinlichkeit der Motivanalyse beider Datensätze ermittelt. Da die Wahrscheinlichkeiten sich auch auf Häufigkeiten der Motive im Zentrum der Sequenzen beziehen, haben Motive, die sehr nahe am Zentrum vorkommen, wie etwa Foxo, signifikantere Werte als z.B. das Runx-Motiv, das insgesamt über einen größeren Radius verstreut war.

Da sich diese Analysen nur auf die 5.000 stärksten Peaks beziehen, wurde nun die Anzahl der Runx-Motive in allen von TWIST2^{WT} und TWIST2^{S146P} gebundenen Sequenzen gezählt. In beiden Datensätzen findet sich in ca. 20% aller Peaks auch ein Runx-Motiv (Tabelle 4.10) und zeigte somit keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante auf.

Tabelle 4.9 Potentielle Kofaktor-Motive in 3xFlag- TWIST2^{WT} und 3xFlag-TWIST2^{S146P} gebundenen Sequenzen. (Siehe auch Abbildung 4.34) Die Tabelle zeigt die Wahrscheinlichkeit von zentral gehäuften Motiven, den Radius in dem diese Häufung auftritt und die absolute Häufigkeit der Motive in TWIST2^{WT} -Peaks und TWIST2^{S146P}-Peaks. Die Werte beziehen sich auf die Sequenzen mit E-Box Motiv in den 5000 stärksten Peaks von Wildtyp und Mutante.

Motiv	Wahrscheinlichkeit des Motivs (p-Wert)	Radius des Motivs [bp] um die Position 0	TWIST2-Peaks mit Motiv	TWIST2 ^{S146P} -Peaks mit Motiv	Differenz (Motiv-Häufigkeit)
Runx1	5,2e-10	90	1412	1281	131
Pdx1	2,7e-13	22	622	599	23
Prrx2	5,7e-04	13	261	233	28
Foxo3	1,3e-31	6	245	225	20

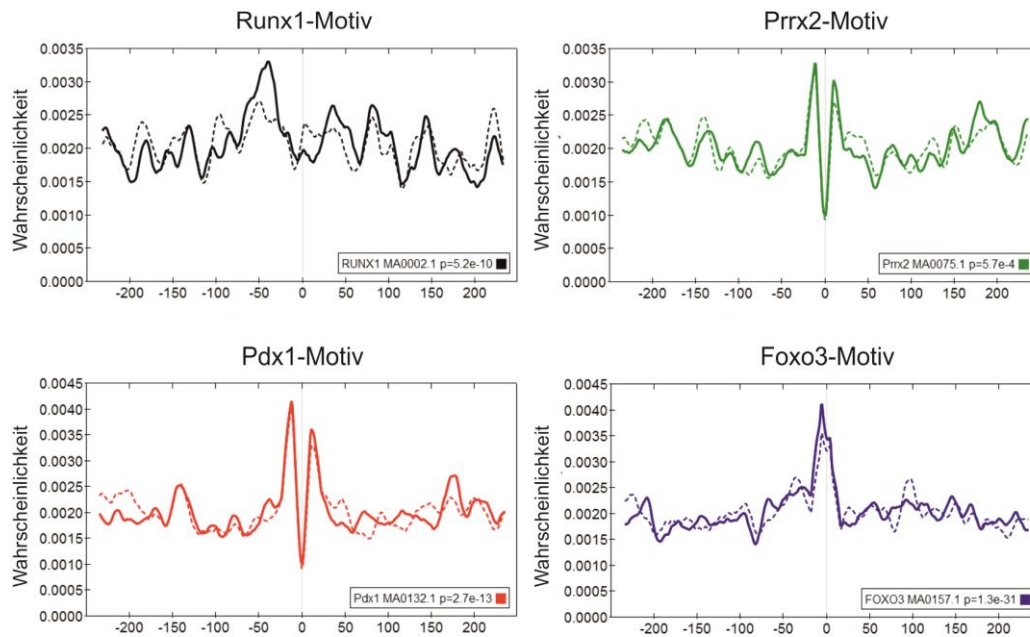


Abbildung 4.34 Motivanreicherung für potentielle Kofaktoren in 3xFlag- TWIST2^{WT} gebunden Sequenzen relativ zu 3xFlag-TWIST2^{S146P} gebundenen Sequenzen. Die Anreicherung der Motive von Runx1, Prrx2 Pdx1 und Foxo3 in den analysierten 3xFlag- TWIST2^{WT}-Sequenzen (durchgezogene Linie) wurde mit Hilfe des Programms CentriMo relativ zur Anreicherung derselben Motive in den 3xFlag-TWIST2^{S146P} Sequenzen ermittelt (gestrichelte Linie).

Für die Motivanalysen mit CentriMo wurden wie gesagt die 5.000 stärksten Peaks gewählt und unter diesen nur solche mit dem Twist-typischen E-Box-Motiv im Zentrum der Peaks selektiert. Diese Peaks können in unterschiedlichen Regionen des Genoms liegen. Um festzustellen, ob es in den Peaks von TWIST2^{WT} oder S146P-Mutante unterschiedliche Bindestellen gibt, wurden für beide Wildtyp und Mutante die Peaks bestimmt, die sich in beiden ChIP-seqs unterscheiden (individuelle Peaks) und einer Motivanalyse mit RSAT unterzogen. RSAT generiert wie DREME *de novo* Motive, vergleicht aber gefundene Motive im Gegensatz zu DREME mit der Jaspas-core-Vertebrate-Datenbank, die bereits bekannte Motive von Transkriptionsfaktoren enthält und erleichtert damit das Identifizieren von potentiellen Kofaktoren.


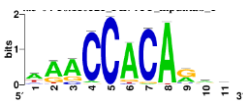
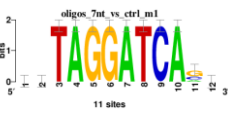
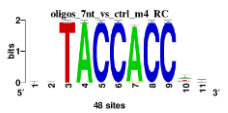
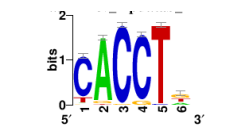


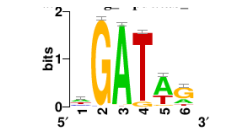
Tabelle 4.10 Anzahl der Peaks in der 3xFlag- TWIST2^{WT} und 3xFlag-TWIST2^{S146P} ChIP-seq mit Runx-Konsensmotiv.

Peaks	3xFlag-TWIST2	3xFLAG-TWIST2 ^{S146P}
Gesamt	27195	22627
Mit Runx- Motiv: YGYGGT	5620	4612
Anteil der Peaks mit Motiv in %	20,67	20,38

Es wurden die Sequenzen der individuellen TWIST2^{WT}-Peaks mit den individuellen TWIST2^{S146P}-Peaks verglichen, indem die individuellen TWIST2^{S146P}-Peaks als negativ-Datensatz bestimmt wurden. Die Verwendung der TWIST2^{S146P}-Peaks als negativ-Kontrolle führt dazu, dass jene Motive ermittelt werden, die im Vergleich zur negativ-Kontrolle überrepräsentiert sind. Falls also Kofaktor-abhängige Interaktionen zu der Bindung der TWIST2^{WT} individuellen Peaks führen, sollten sich diese so ermitteln lassen.

Das Ergebnis der Motivanalyse ist in Tabelle 4.11 aufgelistet. Es wurden insgesamt fünf Motive ermittelt. Für nur drei der Motive sind Transkriptionsfaktoren bekannt, die ähnliche Motive binden. Zum einen ist eine Sequenz angereichert, dessen letzten vier Basen in dem Motiv des Transkriptionsfaktor GATA3 vorkommen und kommt in individuellen TWIST2-Peaks 46 mal vor. Des Weiteren wird in 56 Peaks ein Motiv ermittelt, das Ähnlichkeit zu dem Erkennungsmotiv des Transkriptionsfaktor ZEB1 hat. Am häufigsten vertreten ist das Runx-Motiv, und kommt in 185 individuellen TWIST2^{WT} -Peaks vor und zeigt abgesehen davon die höchste Ähnlichkeit zum ermittelten Jaspar-Motiv.

Tabelle 4.11 Vergleich der in individuellen 3xFlag-TWIST2-Peaks relativ zu 3xFlag-TWIST2^{S146P}-Peaks angereicherten Motive.

Motiv (RSAT)	Anzahl der Peaks mit Motiv	Potentiell bindender Transkriptionsfaktor	RSAT ermitteltes Jaspar-Motiv
	185	Runx	
	70	-	-
	56	ZEB1	
	49	-	-
	46	GATA3	

5 Diskussion

Die Entwicklung des Skeletts unterliegt komplexen genregulativen Netzwerken. Diese bestehen aus Transkriptionsfaktoren, die sich untereinander regulieren und mittels der Genregulierung die Differenzierung kontrollieren. Durch Mutationen von Transkriptionsfaktoren können deren Funktionen in der DNA- und Protein-Interaktion gestört werden, was zu Veränderungen der Entwicklung führen kann. Mit Hilfe neuer Technologien wie der ChIP-seq können genomweite Bindestellen von Transkriptionsfaktoren *in vivo* abgebildet werden. Durch die Analyse der gebundenen Sequenzen besteht die Möglichkeit, neue Zielgene, aber auch mögliche Kofaktoren zu identifizieren, die mit einem Transkriptionsfaktor an der Doppelhelix interagieren. Zusätzlich können Veränderungen der DNA-Interaktionen durch Mutationen in Transkriptionsfaktoren untersucht werden.

Das Gelingen von ChIP-seq-Experimenten ist stark abhängig von der Spezifität von Antikörpern. Gerade der Vergleich von Experimenten wie von *missense*-Mutationen und den wildtypischen Proteinen bedarf einer hohen Vergleichbarkeit. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich mit Transkriptionsfaktoren gearbeitet, die mit einem Flag-Epitop versehen wurden. Dies ermöglicht die Verwendung des hoch spezifischen anti-Flag-Antikörpers und somit eine von unterschiedlichen Antikörperaffinitäten unabhängige Präzipitation der Protein-DNA-Komplexe.

5.1 Expression von 3xFlag-fusionierten Transkriptionsfaktoren in Hühner-Micromasskulturen

Um mittels ChIP-seq neue Faktoren zu identifizieren, die Teil des genregulativen Netzwerkes der chondrogenen und osteogenen Differenzierung sind, sollten Zielgene der zwei Transkriptionsfaktoren RUNX2 und MSX2 ermittelt werden. Dafür wurden die Transkriptionsfaktoren mit einem 3xFlag-Epitop fusioniert, retroviral in Hühner-Micromasskulturen exprimiert und zuerst deren Auswirkung auf die chondrogene und osteogene Differenzierung beschrieben. Die Expression dieser 3xFlag-Varianten in Hühner-Micromasskulturen zeigte die erwartete Regulation verschiedener Differenzierungsmarker. Entsprechend der Funktion von RUNX2 *in vivo* differenzierten *3xFlag-RUNX2*-exprimierende Kulturen schneller, wie die gesteigerte Expression chondrogener und osteogener Differenzierungsmarker zeigt. Die gesteigerte *Col10a1*-Expression und Produktion von Knorpelmatrix deuten darauf, dass die Zellen früher das Stadium der Hypertrophie erreichen.

Der vergrößerte Durchmesser der Alcian-Blau gefärbten Kulturen (Abbildung 4.1) spricht dafür, dass eine größere Anzahl der Zellen aus den Kulturen in die chondrogene Linie differenziert. Die Tatsache, dass das Runx2-Zielgen *Osteocalcin* nicht deutlich reguliert ist, könnte seine Ursache darin haben, dass es von Zellen exprimiert wird, die ausschließlich der Osteoblastenlinie angehören (Ducy et al., 1997), während der überwiegende Teil der Zellen in Hühner-Micromasskulturen in Chondrozyten differenziert. Runx2 ist in der embryonalen Entwicklung sowohl in Chondrozyten als auch Osteoblasten exprimiert und treibt deren Differenzierung voran. Außerdem wird beschrieben, dass mesenchymale Zellen, die Runx2 exprimieren, das Potential haben, sowohl entlang der osteogenen als auch chondrogenen Linie zu differenzieren (Nakashima et al., 2002). Es bedarf wahrscheinlich der Expression zusätzlicher Faktoren, um mesenchymale Zellen dieser Kulturen weiter in eine osteogene Richtung zu treiben. Die homogen verteilte Aktivität der Alkalischen Phosphatase spricht zumindest für das Potential der Zellen, in die Osteoblastenlinie zu differenzieren: Alkalische Phosphatase ist während der Entwicklung in frühen Osteoblasten aktiv, also zeitlich noch vor der Expression von *Osteocalcin* (Owen et al., 1990).

Die Expression von *3xFlag-MSX2* zeigte wie erwartet eine Repression der chondrogenen und osteogenen Differenzierung. Die nur leicht verminderte Expression von *Col2a1* deutet auf das Vorhandensein von Chondrozyten, aber die kaum messbare Expression von *Col10a1* zeigt, dass die Chondrozyten nicht weiter differenzieren. Dies zeigt auch die stark verminderte Produktion von Knorpelmatrix.

Die gesteigerte Expression von *Colla1* in MSX2-infizierten Zellen spricht für dessen Funktion in der Förderung der Proliferation osteogener Zellen und Blockade der frühen Differenzierung (Satokata et al., 2000). *Colla1* wird durch aktiv proliferierende Zellen sezerniert, die später dann mit der Expression der *Alkalischen Phosphatase* den ersten Schritt in Richtung Osteoblastendifferenzierung machen (Owen et al., 1990). Dies bestätigt sich auch in der stark begrenzten Aktivität der Alkalischen Phosphatase in der Peripherie der Kulturen. Die Expression der zwei Differenzierungsmarker *Osteocalcin* (*BGLAP*) und *bone sialoprotein 2* (*IBSP*) war vergleichbar mit der Kontrolle und geht mit den vorherigen Beobachtungen einher, dass die Differenzierung bis hin zu reifen Osteoblasten oder gar Osteozyten in Hühner-Micromasskulturen eher nicht oder nur sehr begrenzt vorkommt und wahrscheinlich weiterer Faktoren bedürfte.

Insgesamt zeigt die Expression von *3xFlag-MSX2* und *3xFlag-RUNX2* in Hühner-Micromasskulturen ein Abbild ihrer Funktion in der osteogenen und chondrogenen Differenzierung und bietet die Möglichkeit, die Funktion beider Transkriptionsfaktoren in einem biologisch nahen System zu untersuchen.

5.1.1 Die Expression von *3xFlag-RUNX2* und seine Rolle im Perichondrium

Die histologische Analyse von Paraffinschnitten *3xFlag-RUNX2*-exprimierender Kulturen zeigte eine im Vergleich zu Kontrollkulturen veränderte Organisation der Zellen. *COL2A1* exprimierende Zellen wurden begrenzt durch mehrere *COL2A1*-negative Zellschichten (Abbildung 4.3). Diese Aufteilung erinnert an den Aufbau des sich entwickelnden Knochens, wo *COL2A1* exprimierende Chondrozyten innerhalb des Perichondriums differenzieren, das aus Fibroblasten und mesenchymalen Vorläuferzellen besteht, die z.B. *COL1A1* exprimieren. Diese Beobachtung in den Micromasskulturen ist überraschend, denn *3xFlag-RUNX2* war in diesen selber homogen exprimiert. *RUNX2* scheint also auch im *in vitro*-System der Micromasskultur das Potential zu haben, unterschiedliche Differenzierungswege in benachbarten Zellen auszulösen.

In der embryonalen Entwicklung ist *Runx2* ebenfalls mit einer doppelten Rolle in Chondrozyten und Osteoblasten belegt. Viele genetische Experimente wie das Deletieren von *Runx2*-Zielgenen (Nakashima et al., 2002) oder die konditionelle Expression von *Runx2* in unterschiedlichen Stadien der Knochenbildung (Takeda et al., 2001; Ueta et al., 2001) verdeutlichten, dass die osteogene Funktion von *Runx2* klar im Perichondrium liegt. In *Runx2*-defizienten Mäusen ist das Perichondrium kaum entwickelt (Nakashima et al., 2002), und in Mäusen, die aufgrund einer Fehlfunktion von *HoxD13* stark verminderte *Runx2*-Expression im Autopod zeigen, fehlt ebenfalls ein funktionsfähiges Perichondrium (Villavicencio-Lorini and Kuss et al., 2010). Dies verdeutlicht die Rolle von *Runx2* für die Aufrechterhaltung des Perichondriums. Dieses hat eine Schlüsselstellung in der Entwicklung des Knochens: Die Osteoblasten, die den Knochen besiedeln, stammen von perichondralen Präosteoblasten ab, die in den Knochen einwandern und erst dort differenzieren (Maes et al., 2010), und *Runx2* ist essentiell für die Determination dieser Zellen im Perichondrium sowie für das Einwandern von mesenchymalen Zellen der Blutgefäße und Präosteoblasten in den Knochen (Nakashima et al., 2002). Daher wurde auch unter den Zielgenen von *Runx2* insbesondere auf solche geachtet, die eine Funktion im Perichondrium haben.

5.2 Auswertung der *RUNX2*-ChIP-seq und potentielle Zielgene von *RUNX2*

Die Auswertung der *RUNX2*-ChIP-seq-Daten ergab für *RUNX2* 12.359 gebundene Regionen genomweit. Die Motivanalysen für die gebundenen Sequenzen zeigten hoch signifikant das *Runx*-Konsensmotiv und bestätigten damit die Spezifität des *3xFlag*-fusionierten-*RUNX2* als Transkriptionsfaktor. Allein 2.487 Peaks, ca. 20 Prozent, befanden sich in Promotornähe der

17.935 Referenzgene und könnten ein Funktion in der Regulation dieser Gene bedeuten. Aus vorigen Untersuchung eines Screens von Genen, die in Humeri von *Runx2*-defizienten Mäuseembryonen reguliert waren, wurden *Cadherin 2* und *Wnt5a* als potentielle Zielgene von *Runx2* identifiziert (Hecht, 2006 sowie Hecht et al., 2007). Beide sind im Perichondrium exprimiert und beeinflussen die endochondrale Ossifikation (Guntur et al., 2012; Witte et al., 2009; Hartmann and Tabin, 2000; Yang, 2003).

CADHERIN 2

In den ChIP-seq-Experimenten von *3xFlag-RUNX2*-exprimierenden Hühner-Micromasskulturen zeigte sich, dass *RUNX2* in einer CpG-Insel in der Promotorregion von *CADHERIN 2* (*CDH2*) sowie in einer CpG-Insel im ersten Intron von *WNT5A* bindet. Die Messung der Expression beider Gene in diesen Kulturen ergab, dass beide Gene durch die ektopische *3xFlag-RUNX2*-Expression hochreguliert waren. *RUNX2* ist zudem in der Lage, den *CDH2*-Promotor in einem Luziferase-Reportervektor auch *in vitro* zu binden und seine Aktivität positiv zu regulieren. Damit wurde gezeigt, dass *RUNX2* das Potential hat, die Expression von *CADHERIN 2* durch die Bindung an dessen Promotor direkt zu beeinflussen. Aufgrund der evolutionär stark konservierten Mechanismen der endochondralen Ossifikation ist es nicht unwahrscheinlich, dass *Runx2* auch in Säugetieren die *CADHERIN2*-Expression direkt reguliert.

Dies wäre auch eine wichtige Erkenntnis für andere molekulare Prozesse wie der Entstehung von Metastasen. An der Zelloberfläche exponiert, gehört *Cadherin 2* zu den Calcium-abhängigen Zelladhäsionsmolekülen. Es ist an der Motilität von Zellen beteiligt und ein Marker für die epitheliale-zu-mesenchymale Transition (EMT) der Zellen (Kim et al., 2000). Dieser Prozess ist entscheidend für die Motilität der Zellen sowie das Verlassen des Gewebeverbandes; er ist an der Entstehung von Metastasen aus Brusttumoren beteiligt (Nieman and Prudoff, 1999). Metastasierende Zellen aus Brusttumoren exprimieren auch *Runx2* (Javed et al., 2005; Leong et al., 2010; Pratap et al., 2008; Chimge et al., 2011). Der Verlust von *RUNX2* durch RNA-Interferenz in Osteosarkom-Zellen blockiert deren Fähigkeit zur Migration in Zellkultur (Van der Deen et al., 2012). Kürzlich wurde *Runx2* auch in Zusammenhang mit der epithelialen-zu-mesenchymalen-Transition (EMT) gebracht (Niu et al., 2012), die z.B. auch durch *Twist*, *Snail*, und *ZEB*- (Zinc finger E-box-binding homeobox) Transkriptionsfaktoren induziert wird, indem diese die Expression von *Cadherin 2* kontrollieren (Sánchez-Tilló et al., 2012). Es wäre daher auch auf Grund der hohen medizinischen Relevanz von großem Interesse, den Einfluss von *Runx2* auf die Motilität der Osteoblasten durch Regulation der *Cadherin 2*-Expression näher zu untersuchen.

WNT5A

Auch *WNT5A* wurde als ein potentielles Zielgen von RUNX2 in Betracht gezogen. *WNT5A* ist ebenfalls im Perichondrium bzw. Periost exprimiert und kontrolliert als sezernierter Botenstoff die Proliferation von prähypertrophen Chondrozyten (Yamaguchi et al., 1999). RUNX2 bindet eine Sequenz im ersten Intron des Hühnchen- *WNT5A*, welche mit einer CpG-Insel überlappt und vor dem Start des für *WNT5A* längsten ESTs liegt (NCBI-Zugangsnummer BU105913). In Mäusen ist ein alternativer Transkriptionsstart für *Wnt5a* im ersten Intron beschrieben (Katoh and Katoh, 2009). Daher wurde diese Sequenz als potentiell durch RUNX2 regulierter Promotor in Betracht gezogen. Luziferase-Assays zeigten allerdings keine direkte Regulation durch RUNX2 *in vitro*, trotz vorhandenen Runx-Bindestellen in dieser Sequenz. Es ist denkbar, dass der genomische Kontext für die Regulation notwendig ist.

5.3 Potentielle Zielgene von MSX2 und RUNX2

Die Auswertung der 3xFlag-MSX2-ChIP-seq ergab genomweit 10.986 Bindestellen. Die Analyse der überrepräsentierten Motive der gebundenen Bereiche stimmte mit Konsensmotiven anderer Transkriptionsfaktoren überein. Zu diesen gehörte auch das Motiv des Transkriptionsfaktors Runx2. In anderen Arbeiten wurde gezeigt, dass *Msx2* und *Runx2* bei einer Koexpression in Zellkultur auf Proteinebene miteinander interagieren und *Msx2* in der Lage ist, die Transaktivität von *Runx2* am *Osteocalcin*-Promotor bzw. einem *Runx2*-responsivem Element in Reporter-Assays zu inhibieren (Hjelmeland et al., 2005; Shirakabe et al., 2001). Es ist anzunehmen, dass *Runx2* und *Msx2* auch genomweit und *in vivo* interagieren und gemeinsam an der Regulation verschiedener Zielgene beteiligt sind. Die Anreicherung des *Runx*-Konsensmotives in den Daten der 3xFlag-MSX2-ChIP-seq ist dafür ein erster experimenteller Hinweis. Insgesamt 1.749 Sequenzen waren sowohl durch 3xFlag-RUNX2 als auch 3xFlag-MSX2 reproduzierbar gebunden, und 748 dieser Peaks lagen in Promotorregionen der 17.935 Referenzgene. Dies sind potentielle Kandidaten für gemeinsam regulierte Gene. Unter diesen wurde ausschließlich nach solchen gesucht, die eine Rolle in der Regulation der Transkription haben. Diese wurden mittels einer Genontologie-Analyse und Literaturrecherchen herausgefiltert. Es muss davon ausgegangen werden, dass auf diese Weise einige Transkriptionsfaktoren übergangen werden, da diese Listen nicht zwangsläufig vollständig sind. Die hier erhaltene Liste (Tabelle 4.3) enthielt jedoch bereits interessante potentielle Zielgene. Unter diesen finden sich auch zwei Mitglieder des Notch-Signalwegs *NOTCH2* und *HEY1*. In der embryonalen Mausentwicklung sind beide an der Aufrechterhaltung von Osteoblastenvorläuferzellen involviert, wahrscheinlich durch eine Protein-Protein-Interaktion des durch Notch aktivierten Hey1 mit *Runx2* (Hilton et al., 2008). Daneben ist der Notch-Signalweg auch an der Inhibierung der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen

während der Chondrogenese beteiligt (Dong et al., 2010). Aufgrund seiner Rolle in der Differenzierung von mesenchymalen Zellen ist der Notch-Signalweg ein interessantes Ziel der Aktivität von Runx2 und Msx2.

5.3.1 Der Notch-Signalweg: Ein möglicher regulativer Schnittpunkt von RUNX2 und MSX2 im genregulativen Netzwerk der Osteoblastendifferenzierung

Regulation des Notch-Signalwegs unter RUNX2 und MSX2

Die Analyse der *NOTCH2*-Regulation sowie weiterer Mitglieder des Notch-Signalwegs zeigte eine starke Zunahme der Expression von *NOTCH2*, den beiden Notch-Effektoren *HEY1* und *HES1* sowie einen leichten Anstieg der Expression des Notch-Liganden *DLL1* in *3xFlag-MSX2*-exprimierenden Hühner-Micromasskulturen. Hingegen war die Expression von *HEY1* und *HES1* in *3xFlag-RUNX2* infizierten Kulturen deutlich reprimiert, die Expression von *NOTCH2* tendenziell aber nur leicht herunterreguliert. Die Expression des Notch-Liganden *DLL1* stieg deutlich in den *3xFlag-RUNX2*-infizierten Kulturen. Dies zeigt einen überwiegend gegenläufigen Effekt von *MSX2* und *RUNX2* auf den Notch-Signalweg und unterstützt die Beobachtung, dass Notch-Signale in die Inhibition der Differenzierung involviert sind.

Eine positive Regulation des Liganden *DLL1* durch *3xFlag-RUNX2* steht zu einer Repression des *NOTCH*-Signalwegs durch *RUNX2* zunächst scheinbar im Widerspruch. Es ist jedoch denkbar, dass *RUNX2* den Notch-Signalweg in solchen Zellen inhibiert, in denen es selbst aktiv ist, und in benachbarten Zellen den Notch-Signalweg stimuliert, z.B. durch die positive Regulation eines *NOTCH*-Liganden, damit die gleichzeitige Differenzierung aller Zellen zum gleichen Zeitpunkt verhindert wird. Um den späteren Prozess der Homöostase für den lebenslangen Knochenabbau und -aufbau gewährleisten zu können, werden lebenslang Vorläuferzellen benötigt, die zu Osteoblasten differenzieren können. Dies bedarf einer kontrollierten Aufrechterhaltung des Notch-Signals. So entwickeln z.B. adulte *Notch1/Notch2*-defiziente Mäuse einen verstärkten Knochenabbau aufgrund der zuvor gesteigerten Differenzierung von Osteoblasten während der embryonalen Entwicklung; sie entwickeln eine Osteopenie (Hilton et al., 2008). Eine Mutation im humanen *NOTCH2*-Gen ist assoziiert mit dem Hajdu-Cheney-Syndrom (OMIM#102500), welches eine schwere Osteoporose auslöst (Simpson et al., 2011). Die Patienten leiden teilweise an Kleinwachstum, nicht verknöchernen Schädelnähten, Auffälligkeiten an Zähnen und am Skelettsystem.

HEY1 unter dem regulativen Einfluss von RUNX2 und MSX2

HEY1 gehört wie auch *HES1* zu den gegenläufig regulierten Notch-Effektoren durch 3xFlag-RUNX2 bzw. 3xFlag-MSX2. *Hey1* gehört auch zu den meist herunterregulierten Genen in den RNA-Expressionsdaten aus Humeri von *Runx2*-knockout-Mäusen zum Zeitpunkt E14.5, also zu einem Zeitpunkt, an dem sich das primäre Ossifikationszentrum zu bilden beginnt. Interessanterweise war die *HEY1*-Expression in Hühner-Micromasskulturen durch ektope *RUNX2*-Expression stark reprimiert und widerspricht damit zunächst den Beobachtungen der *Runx2*-knockout-Daten. Sowohl 3xFlag-MSX2 als auch 3xFlag-RUNX2 banden in einer konservierten Region ca. 4.300 Basenpaare vor dem *HEY1*-Transkriptionsstart. *RUNX2* reprimierte die Luziferase-Aktivität durch die Anwesenheit dieser Sequenz in einem Reporter-Vektor in Luziferase-Assays jedoch nur schwach, trotz eines Runx-Motivs in dieser Sequenz. Allerdings war dieser milde Effekt durch *RUNX2*^{Q209R} aufgehoben und könnte tatsächlich auf eine direkte Regulation deuten. So sollten die Reporterexperimente in weiteren Zelllinien wiederholt werden. Für eine Repression in Luziferase-Experimenten wäre eine deutliche Aktivierung der Luziferase durch endogen exprimierte Faktoren vorteilhaft. Dies war in CV1-Zellen nicht gegeben. Bei weiteren Reporterexperimenten könnte dann auch die zum *RUNX2*-Peak benachbarte Sequenz einbezogen werden, die durch *MSX2* gebunden wurde und im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden konnte.

Dass *Hey1* als Zielgen für *Msx2* und *Runx2* von Interesse wäre, liegt an seiner inhibierenden Wirkung auf die Osteoblastendifferenzierung (Dong et al., 2010). *Hey1* wird durch die Notch-ICD aktiviert. In Zellkultur koexprimiert interagiert *Hey1* mit *Runx2* und inhibiert *Runx2* in seiner transaktivierenden Funktion eines *Runx2*-Reportkonstruktes (Hilton et al., 2008). Es wurde daher vermutet, dass die *Hey1*-abhängige Inhibition von *Runx2* ein wichtiger Mechanismus in der Inhibition der Differenzierung von Osteoblastenvorläuferzellen durch den Notch-Signalweg ist (Hilton et al., 2008).

Neben der Aktivierung von Zielgenen der Differenzierung ist die zeitgerechte Inaktivierung einer Differenzierungsblockade ein wichtiger entwicklungsbiologischer Mechanismus. *Runx2* ist einer der ersten Transkriptionsfaktoren in mesenchymalen Vorläuferzellen, der die Differenzierung einleitet (Ducy et al., 1997). Dafür müssen demnach auch Faktoren und Prozesse blockiert werden, die zuvor die Differenzierung verhinderten. Solch eine inhibierende Funktion auf die Differenzierung wurde dem Notch-Signalweg in der Osteoblastendifferenzierung zugewiesen (Hilton et al., 2008) und könnte ein mögliches Ziel von *Runx2* sein, um die Differenzierung der Vorläuferzellen zu initiieren. *MSX2* könnte eine gegenläufige Wirkung auf den Notch-Signalweg haben, um die Differenzierung zu verhindern und die Anzahl von Vorläuferzellen zu kontrollieren. Die entgegengesetzte Regulation der *HEY1*-Expression durch 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-RUNX2 in Hühner-Micromasskulturen unterstützt diese Hypothese.

Die Regulation von NOTCH2 durch MSX2 und RUNX2

Die Untersuchung der Promotorregion von *NOTCH2* zeigte eine Bindung durch 3xFlag-MSX2 und 3xFlag-RUNX2 unmittelbar vor dem ersten Exon. Viele weitere Peaks verteilten sich über den gesamten Genlocus. Luziferase-Experimente mit der klonierten Promotorregion von *NOTCH2* zeigten eine deutliche Aktivierung durch 3xFlag-MSX2. Dies war auch deshalb interessant, weil Msx-Proteinen bisher eine hauptsächlich inhibitorische Wirkung auf die Transkription zugeschrieben wurde. Dies liegt in der inhibierenden Interaktion von Msx2 mit einer Untereinheit des TFIIF-Komplexes begründet, der für die RNA-Polymerase II-abhängige Transkription essentiell ist (Semenza et al., 1995; Newberry et al., 1997).

RUNX2 zeigt auf die Aktivität des *NOTCH2*-Promotor-Luziferase-Konstrukts wenn überhaupt nur eine leichte inhibitorische Wirkung. Die DNA-bindedefiziente RUNX2-Variante Q209R zeigte hingegen eine leicht positive Stimulation der Luziferase-Aktivität. Dieser Effekt war insgesamt sehr schwach und könnte evtl. indirekt durch Interaktionen mit endogenen Faktoren hervorgerufen worden sein. Der gleiche Effekt bestätigte sich bei der Transfektion des murinen Runx2- und Runx2^{Q209R}-Homologs. Aufgrund der schwachen Regulation war es nicht möglich, eine direkte Interaktion mit dem Promotor durch Runx2 in Zellkultur zu verifizieren. Das Experiment sollte in anderen Zelllinien wiederholt werden, um den Einfluss unterschiedlicher endogener Expression anderer Faktoren zu überprüfen, wenn eine Regulation *in vitro* bestätigt oder ausgeschlossen werden soll. Abgesehen davon ist es möglich, dass auch hier die Isolation dieser Sequenz aus dem genomischen Kontext für eine Regulation durch Runx2 nicht ausreicht.

5.3.2 Der Einfluss der Notch-Signalkaskade auf die Differenzierung in Hühner-Micromasskulturen

Die Inhibition der Notch-Signalkaskade führt zu einer verstärkten Differenzierung in Hühner-Micromasskulturen.

Die Inhibition der Notch-Signalkaskade durch DAPT-Zugabe verstärkte die Produktion von Knorpelmatrix und Expression des Chondrozytenmarkers *COL10A1* und ging einher mit einer Steigerung der *RUNX2*-Expression. Dies zeigt eine endogene Rolle des Notch-Signalwegs während der Differenzierung von mesenchymalen Zellen sowie eine endogene Regulation der *RUNX2*-Expression durch den Notch-Signalweg in diesen Kulturen. Weitere Differenzierungsmarker wie *IHH* und die Osteoblastenmarker *IBSP*, *BGLAP* und *SPP1* waren verstärkt exprimiert; dies spricht für eine verstärkte Differenzierung sowohl von Chondrozyten als auch von Osteoblasten. Auch steht sie im Einklang mit der gesteigerten Expression von *Col10a*, *Ihh* und *Ibsp* in der embryonalen Tibia von *Notch1/Notch2*-defizienten Mäusen (Hilton

et al., 2008). Dies deutet auf eine Konservierung der Notch-Funktion in der Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen des Knorpels bzw. Knochens. Die gesteigerte Produktion von Knorpelmatrix durch eine DAPT-Behandlung wurde ebenfalls in murinen Micromasskulturen gezeigt und konnte sowohl für die Inhibition des Notch-Signalwegs, als auch mit einer RNA-Interferenz unter Verwendung spezifischer siRNAs mit dem Notch-Effektor *Hes1* erzielt werden (Dong et al., 2010); dies bestätigt die im Rahmen dieser Arbeit gemachten Beobachtungen und legt eine Konservierung dieses genregulatorischen Mechanismus in Maus und Huhn nahe.

Die Aktivierung des Notch-Signalwegs in Hühner-Micromasskulturen führt zu einer Inhibition der Differenzierung.

Das Notch-Signal wird über die Notch-Effektoren in die Regulation der Gentranskription umgesetzt. Um diesen Einfluss auf die Genregulation von differenzierenden mesenchymalen Zellen in Hühner-Micromasskulturen zu testen, wurde die Notch-Signalkaskade durch die Überexpression der *NOTCH2*-ICD ektopisch aktiviert. Die resultierende Inhibition von *COL10A1*, *IBSP* und *AKP2* lässt eine verminderte Differenzierung von Chondrozyten und Osteoblasten in Hühner-Micromasskulturen vermuten. Die Arbeit von Dong et al. (2010) veröffentlichte die konditionelle Expression der Notch-ICD in der Maus unter Kontrolle des *Prx1*-Promotors während der Embryonalentwicklung. Dieser führt zu einer Überexpression in mesenchymalen Zellen der Extremitäten und des Schädels, welche später u.a. die Skelettelemente bilden (Logan et al., 2002). Die Überexpression von Notch-ICD führte dazu, dass das Wachstum und die Verknöcherung der Extremitätenknochen sowie der Calvaria ausblieb (Dong et al., 2010). Es zeigt damit die inhibierende Wirkung des Notch-Signalwegs auf die Differenzierung von mesenchymalen Skelettvorläuferzellen und bietet somit Hinweise auf eine mögliche *in vivo*-Interaktion von *Runx2* und *Msx2*. Beide binden den Promotor von *NOTCH2* in Micromasskulturen aus primären mesenchymalen Zellen und *MSX2* ist auch in der Lage, diesen *in vitro* zu regulieren.

Da eine Regulation von *Notch2* durch *Runx2* *in vivo* nicht auszuschließen ist, wurde zudem die Expression von *Notch2* in Humeri sowie Radius und Ulna von wildtypischen Mäusen mit denen von *Runx2*-defizienten Mäusen mittels Immunfluoreszenz untersucht. Die Untersuchung zeigte, dass *Notch2* sowohl in den prähypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert ist, als auch im primären Ossifikationszentrum und im sich ausbildenden Periost. In hypertrophen Chondrozyten, im Perichondrium und im Periost ist auch *Runx2* exprimiert; so besteht die Möglichkeit, dass *Runx2* an einer Regulation von *Notch2* beteiligt ist.

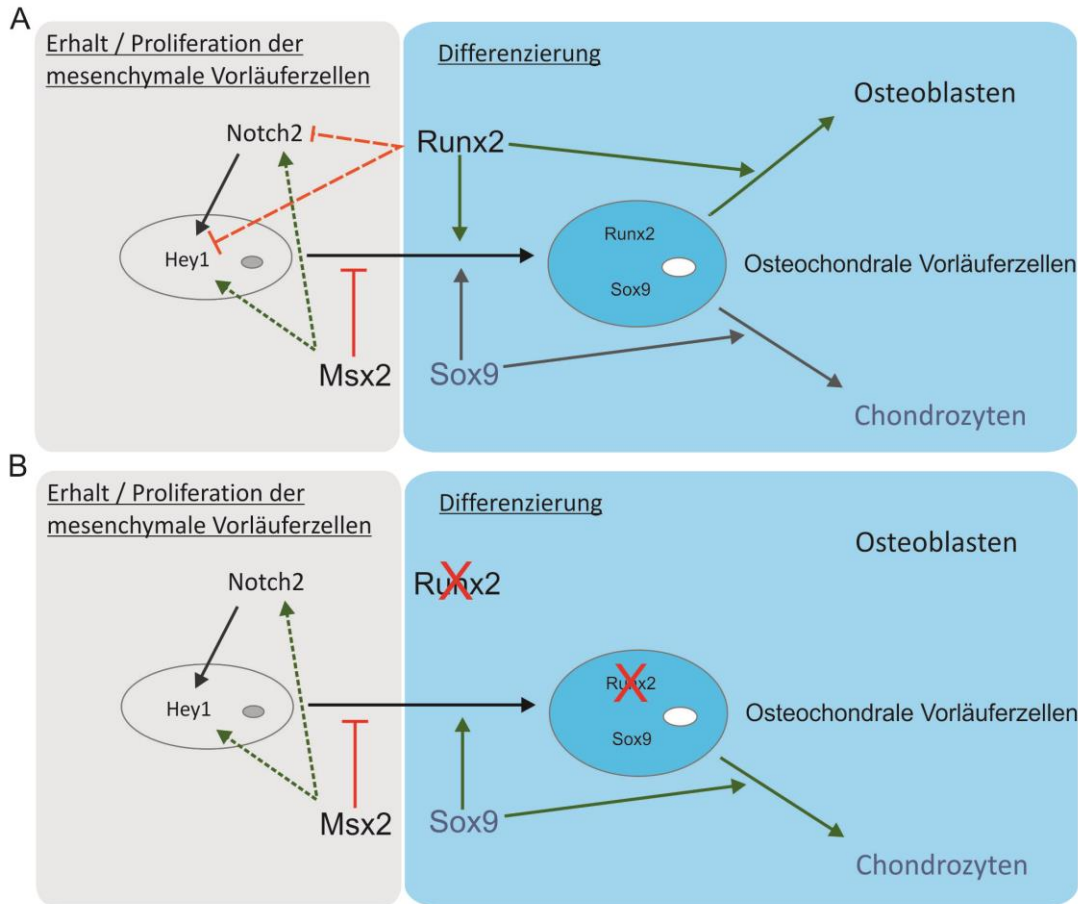


Abbildung 5.1 Schematische Darstellung: Mögliches Szenario der regulativen Beziehung von Runx2, Msx2 und Notch2 während der Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen. A) Msx2 inhibiert die Differenzierung von Osteoblasten durch eine positive Regulation von Notch2 und Hey1. Runx2 oder Sox9 hingegen stimulieren die Differenzierung von Vorläuferzellen. Während Sox9 die Differenzierung in Chondrozyten positiv reguliert, leitet Runx2 die Differenzierung in Osteoblasten ein. Dafür inhibiert Runx2 den Notch-Signalweg in Zellen, in denen es selber exprimiert und funktional ist. Dies könnte direkt oder indirekt z.B. über die Inhibition von Msx2 geschehen. B). In Abwesenheit von Runx2 könnten andere Transkriptionsfaktoren die Differenzierung positiv regulieren (z.B. Sox9), und somit z.B. die Differenzierung der Vorläuferzellen in Chondrozyten veranlassen.

In *Runx2*-defizienten Mäusen fehlte ein Notch2-Signal in den Chondrozyten des Humerus sowie im Perichondrium. Sollte Runx2 die *Notch2*-Transkription reprimieren, wäre aber ein stärkeres Signal für Notch2 in den knockout-Mäusen zu erwarten gewesen. In *Runx2*-knockout Mäusen unterscheiden sich die Konsequenzen des *Runx2*-Verlusts in den Knochen des Humerus von denen in Radius und Ulna (Zeugopod). Es konnte gezeigt werden, dass die Chondrozyten des Zeugopods im Gegensatz zu denen des Humerus noch hypertroph werden und die Matrix sogar beginnt zu mineralisieren (Komori et al., 1997; Komori and Kishimoto, 1998). Das könnte daran liegen, dass Humerus und die Knochen des Zeugopods nicht synchron differenzieren; viel wahrscheinlicher liegt es aber auch daran, dass die Bedeutung von Runx2 von proximal (Humerus) nach distal hin abnimmt (Stricker, 2002). So unterschieden sich in *Runx2*-defizienten Mäusen auch die Chondrozyten des Humerus morphologisch von denen in Radius und Ulna: Die Chondrozyten der *Runx2*^{-/-}-Humeri waren morphologisch vergleichbar mit denen

des permanenten Knorpels, wie er in den Epiphysen vorkommt. Diese permanenten Knorpelzellen exprimierten auch im Wildtyp kein *Notch2*. Die Abwesenheit von *Notch2* in den *Runx2*^{-/-}-Humeri könnte also damit erklärt werden, dass die Zellen des Humerus aufgrund der Einwirkung chondrogener Master-Transkriptionsfaktoren (wie den Sox-Transkriptionsfaktoren, die üblicherweise durch *Runx2* herunterreguliert werden) in Knorpel differenzieren, ähnlich dem des permanenten Knorpels in den Epiphysen, und dabei auch die *Notch2*-Expression verlieren (Abbildung 5.1).

Der Verlust der Expression im Perichondrium könnte einen ähnlichen Grund haben. Das Perichondrium in *Runx2*-defizienten Mäusen ist morphologisch schwach ausgebildet und auch hier könnten mesenchymale Vorläuferzellen bereits differenziert sein, ohne in den Knochen einzuwandern. Diese Hypothese müsste nun mit Expressionsanalysen verschiedener Differenzierungsmarkern im Perichondrium und Zellen des Humerus überprüft werden.

Sollte dies zeigen, dass die Zellen des Perichondriums tatsächlich differenzieren, und nicht wie in Wildtypen aus mesenchymalen Vorläuferzellen bestehen, würde dies auch bedeuten, dass die Expression von *Runx2* im Wildtyp sowohl das Differenzieren von Osteoblasten, als auch den Erhalt von Vorläuferzellen erlaubt. Diese Hypothese würde weiterhin zulassen, dass *Runx2* neben einer inhibitorischen auch eine stimulierende Wirkung auf den Notch-Signalweg haben könnte, um Vorläuferzellen von der Differenzierung vorerst auszuschließen. Die Zunahme der Expression des Notch-Liganden *DLL1* in *RUNX*-exprimierenden Micromasskulturen könnte solch einen Mechanismus ermöglichen (siehe auch Abschnitt 5.3.1 und Abbildung 5.2).

Dies sind sehr spekulative Erklärungen über mögliche regulative Beziehungen von *RUNX2* und *NOTCH2*, welche sehr komplex zu sein scheinen. Es müssten hier noch weitere Expressionsanalysen verschiedener Kandidaten wie *Dll1*, *HEY1* und von Differenzierungsmarkern in unterschiedlichen embryonalen Stadien durchgeführt und analysiert werden. Weitere Expressionsanalysen von *Notch2* könnten auch noch in den Calvarien von *Runx2*-defizienten Mäusen aufschlussreich sein, denn es konnte gezeigt werden, dass die heterozygote Deletion von *Twist1* in Mäusen zu einer Expansion des *Notch2*-Signals in den Calvarien führt. Diese Mäuse entwickeln eine Craniosynostose (Yen et al., 2010). Diese Beobachtung legt eine Funktion von *Notch2* in der Differenzierung der Calvarien nahe, die in *Runx2*-defizienten Mäusen ebenfalls betroffen sind. In den Calvarien könnten auch weitere vergleichende Analysen der *Notch2* und *Msx2*-Expression vorgenommen werden.

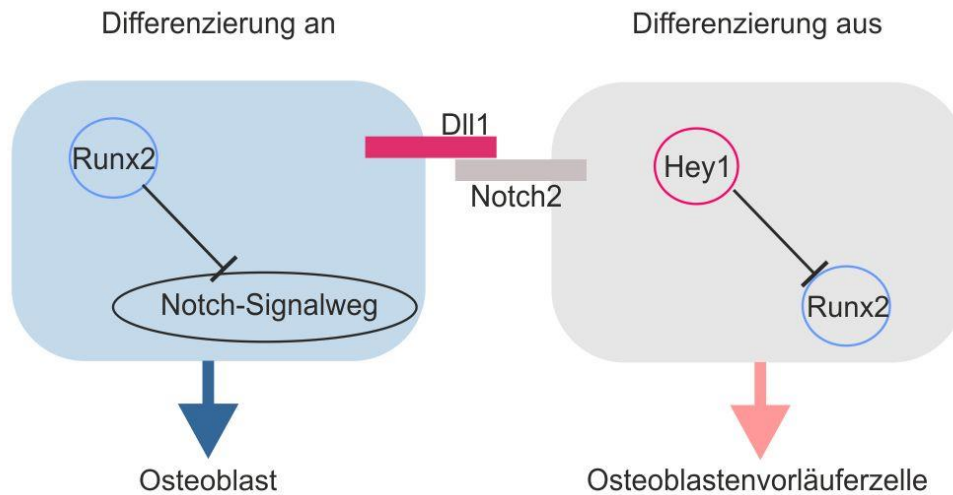


Abbildung 5.2 Schematische Darstellung einer möglichen positiven und negativen Regulation des Notch-Signalwegs durch Runx2. Zellen im Perichondrium, die *Runx2* exprimieren und verlieren dabei das Notch-Signal. Diese Zellen exprimieren auch *Dll1* und stimulieren so die Aufrechterhaltung des Notch-Signals in benachbarten Zellen, die vorerst nicht differenzieren. In diesen Zellen inhibiert z.B. *Hey1* die Aktivität von *Runx2*.

5.4 Vergleichende Analysen von Transkriptionsfaktoren

Neben der Identifizierung von Zielgenen kann mittels ChIP-seq das Bindeverhalten zweier Transkriptionsfaktoren verglichen werden. So können etwa Unterschiede im DNA-Bindeverhalten von Transkriptionsfaktoren und deren *missense*-Mutationen aufgezeigt werden, die z.B. zu humangenetischen Erkrankungen führen. Die Fehlfunktion durch eine veränderte DNA-Bindung kann sowohl durch *missense*-Mutationen in DNA-bindenden Domänen als auch Protein-Protein-Interaktions-Domänen von Transkriptionsfaktoren hervorgerufen werden. Durch ChIP-seq-Analysen von gebundenen DNA-Abschnitten können sowohl Veränderungen in der Motiverkennung als auch in der Protein-Interaktion mit Kofaktoren an der DNA untersucht werden, die z.B. die gebundene Auswahl der Zielsequenzen beeinflussen kann. Dafür ist es zunächst belanglos, welche Gene durch die Bindung der Sequenzen reguliert werden. So können alle gebundenen Sequenzen erst einmal in die Primäranalysen einbezogen werden. Dies sollte im zweiten Teil dieser Arbeit für *Msx2* und *Twist2* sowie verschiedene *missense*-Mutationen geschehen.

5.4.1 Vergleichende Analyse von *MSX2* und drei *MSX2*-Mutationen mittels ChIP-seq

Die Motivanalyse der Sequenzen der 3xFlag-*MSX2*-ChIP-seq zeigte die Anreicherung verschiedener Motive, die dafür bekannt sind, von anderen Transkriptionsfaktoren gebunden zu werden. Das veröffentlichte *Msx2*-Konsensmotiv (Abbildung 5.3 A) mit der Kernsequenz

(C|T)AATTA war nicht unter den Ergebnissen der DREME-Analyse. Das Msx2-Konsensmotiv wurde mittels der isolierten Homöodomäne und Protein-Binde-Microarrays generiert (Berger et al., 2008). Dieses Motiv hat Ähnlichkeit zu dem Motiv CAAT(C|G)A, welches deutlich im Zentrum der Sequenzen von 3xFlag-MSX2-Peaks angereichert war. Der Vergleich dieses Motivs mit denen der Jaspar-Datenbank „*Core Vertebrate*“ zeigte die größte Ähnlichkeit mit einem Motiv des Transkriptionsfaktors NFYA, doch muss auch beachtet werden, dass ein Msx-Konsensmotiv in der verwendeten Jaspar-Vergleichsdatenbank nicht enthalten war. Der Vergleich mit der Datenbank „*Human and Mouse*“ (Jolma 2013), die auf den Daten von Jolma et al., 2013 beruht, wird auch das Msx2-Motiv als ähnliches Motiv identifiziert (Abbildung 5.3 B). Jolma et al. verwendeten für die Generierung des Msx2-Motivs ebenfalls nur die Msx2-DNA-Bindedomäne, allerdings wurde auch von CHIP-seq-Experimenten mit dem vollständigen Msx1-Protein eine Konsenssequenz ermittelt, die mit dem Msx2-Konsensmotiv der Studie identisch ist. Ob Msx2 in der Lage ist, das hier beobachtete CAAT(C|G)A Motiv zu binden und vielleicht sogar stärker, als das bisher beschriebene Motiv, oder ob es das Motiv eines Kofaktors wie NFYA ist, wird noch z.B. mittels EMSAs überprüft. Weitere hier ermittelte Motive zeigten Ähnlichkeiten zu denen der Transkriptionsfaktoren E2F1 und NFIC bzw. NFYA. E2F1 gehört zu den E2F-Transkriptionsfaktoren und kontrolliert den Zellzyklus. NFIC (*nuclear factor-IC*) interagiert mit Smad-Transkriptionsfaktoren und ist beteiligt an der Proliferation und Differenzierung von Odontoblasten in der embryonalen Zahnentwicklung, bei der z.B. auch Msx-Proteine eine Rolle spielen (Lee et al., 2009, 2011; Luciakova et al., 2011; Satokata et al., 2000; Jumlongras et al., 2001; Satokata and Maas, 1994). NFYA (*nuclear factor Y, subunit A*) ist die Untereinheit des NF-Y-Komplexes, der spezifisch die CCAAT-Box in Promotoren bindet. Er kommt insbesondere gehäuft in 60 bis 100 bp vor dem Transkriptionsstart vor und ist von stark GC-reichen Sequenzen umgeben (Dolfini et al., 2009).

Die Motive von E2F- und NFY-Transkriptionsfaktoren sind in vielen Promotoren enthalten und essentiell für die Gentranskription von Zell-Zyklus-assoziierten Genen (Elkon et al., 2003). Msx-Proteine interagieren mit Transkriptionsfaktoren des Transkription-Initiations-Komplexes, der ebenfalls unmittelbar am Transkriptionsstart assembliert, und inhibieren die Transkription (Zhang et al., 1996; Newberry et al., 1997).



Abbildung 5.3 Msx2-Motivvergleich. A) Das von Berger et al 2008 veröffentlichte Msx2-Konsensmotiv für Msx2 (Logo: Uniprobe-Datenbank). B) Der Motivvergleich mit der in Jaspar integrierten Motivanalysen von Jolma et al. (2013) ergab eine starke Ähnlichkeit zwischen dem veröffentlichten Msx-Konsensmotiv (oben) (Jolma et al., 2013) und dem in der 3xFlag-Msx2-ChIP-seq ermittelten CAATSAR-Motiv.

So könnte eine Interaktion von oben genannten Transkriptionsfaktoren mit Msx2-Proteinen denkbar sein. Allerdings zeigten die Analysen auch, dass die Motivanalysen durch nicht vollständige Motiv-Datenbanken beeinflusst sein können. So sind noch ausführlichere Motivanalysen erforderlich, um die Sequenzen der ko-angereicherten Motive genauer zu beschreiben. Auch müssten funktionelle Experimente durchgeführt werden, um die Relevanz dieser Motive in MSX2-gebundenen Sequenzen zu verstehen.

5.4.2 Die MSX2-Mutationen MSX2^{L13P} und MSX2^{R31H}

Von den MSX2-Varianten L13P und R31H wird vermutet, dass sie einen Verlust der DNA-Bindung zur Folge haben. Beide Mutationen sind nicht mehr in der Lage, den *NOTCH2*-Promotor in einem Luziferase-Experiment zu aktivieren und lassen darauf schließen, dass eine Protein-DNA-Interaktion mit dem Promotor nicht mehr erfolgt. Die histologische Untersuchung der Hühner-Micromasskulturen zeigte den Verlust der Inhibition der Differenzierung, wie sie sonst durch die Expression des wildtypischen MSX2 ausgelöst wird. Dies bestätigte somit einen Verlust der MSX2-typischen Funktion als Transkriptionsfaktor für beide Mutanten. Die Bewertung der ChIP-seq Ergebnisse beider Mutanten zeigte allerdings, dass beide noch in der Lage sind, DNA zu binden. Denn für beide wurden mit Hilfe der IDR-Analyse (Li et al., 2011; Landt et al., 2012) replizierbare Peaks identifiziert. Insgesamt war die DNA-Bindung aber deutlich schwächer als bei MSX2^{WT} oder der P7H-Mutation. Dies zeigte sich etwa in der deutlich verringerten Anzahl reproduzierbarer Peaks. Es ist also durchaus möglich, dass auch endogen eine spezifische Interaktion mit DNA noch zustande kommt und zeigt, dass die Analyse von ChIP-seq-Daten neue Informationen zu den hier untersuchten MSX2-Mutationen bringen kann. Außerdem ist interessant, dass – obwohl beide Mutanten phänotypisch einen

Funktionsverlust zeigen – dieser in der Analyse der ChIP-seq unterscheidbar ist. Die L13P-Mutante bindet verstärkt in Promotoren, Exonen und Gen-flankierenden Regionen, während die R31H sich aufgrund der zunehmend gebundenen Regionen in intergenischen Bereichen von der Verteilung im Wildtyp unterscheidet.

Trotz replizierbarer DNA-Bindung konnten in der Motivanalyse der von R31H gebundenen Sequenzen keine spezifischen MSX2-Motive oder Kofaktor-Motive ermittelt werden. Dies deutet auf einen starken Funktionsverlust der R31H durch den Verlust der Sequenz-spezifischen DNA-Erkennung. Die Position 31 in der Helix-II der Msx-Homöodomäne ist entscheidend für die Position von Helix-II und Helix-III der Homöodomäne zueinander (Li et al., 1997). Letztere kontaktiert die große Furche der Doppelhelix und übernimmt den größten Anteil der Sequenzerkennung (Billeter, 1996). Das Arginin an Position 31 bildet über den Kontakt mit dem Glutamat an Position 42 eine Salzbrücke und ist in allen Msx-Homöodomänen konserviert (Hovde et al., 2001; Li et al., 1997). In einem Homöobox-Protein in Hefen (*Mata2*), das eine ähnliche Homöodomäne zu Msx hat, befindet sich an Position 32 zwar ein Glutamat, welches aber ein Arginin an Position 42 über eine Salzbrücke bindet – also genau umgekehrt – und bestätigt die wichtige Position dieser zwei Aminosäuren zueinander (Li et al., 1997). Die Mutation führt wahrscheinlich zu einer Konformationsänderung der Homöodomäne und resultiert im Verlust der Msx2-spezifischen DNA-Bindung in der großen Furche der Doppelhelix.

Für die von MSX2^{L13P} gebundenen Sequenzen konnten ebenfalls keine Motive gefunden werden wie sie für MSX2 beobachtet wurden. Doch scheint L13P im Gegensatz zu R31H noch spezifische Sequenzen zu binden, denn es wurden Motive gefunden, die stark überrepräsentiert sind. Die Tatsache, dass ein Drittel der L13P-Bindestellen in Promotoren liegt, könnte ein Grund für die Anreicherung von Promotor-typischen Motiven wie denen von basalen Transkriptionsfaktoren sein, die in der Regel GC-reich sind. Zuerst muss also überprüft werden, ob die Motive mit einer spezifischen direkten oder indirekten Bindung von MSX2 an diese Sequenzen verbunden sind oder, ob es sich eher um typische Motive in GC-reichen Konsensus-Promotoren handelt, die durch die vielen repetitiven Bindungsstellen in Promotoren dann überrepräsentiert wären.

Das Leucin an Position 13 der Msx2-Homöodomäne ist eine hydrophobe Aminosäure und gehört zu den Aminosäuren, die für die amphipathische Natur von alpha-Helices, wie sie in der Homöodomäne vorkommen, verantwortlich sind (Kissinger et al., 1990; Qian et al., 1989; Shang et al., 1994). Eine Substitution von Leucin zu Prolin könnte die amphipathische Natur der Helix verändern. Dies könnte den ersten, unspezifischen DNA-Kontakt, der auf elektrostatischen Interaktionen beruht, verändern, bevor es zur Bindung spezifischer DNA-Motive kommt. Weiterhin hat die Einführung eines Prolins in eine Helix eine destabilisierende Wirkung auf diese, da Prolin die für die Helices notwendigen Wasserstoffbrücken nicht bilden

kann; es ist eher bekannt dafür, sich am N-Terminus einer Helix zu befinden, da es aufgrund seiner Ringstruktur einen Knick in das Rückgrat der Helix einführt (Kim and Kang, 1999; Richardson and Richardson, 1988). Die Einführung solch eines Knickes könnte zu einer veränderten drei-dimensionalen Struktur der Helix und damit zu einer veränderten DNA-Erkennung führen.

Die Tatsache, dass für die Peaks sowohl in der L13P- als auch R31H-Mutation keines der bei $MSX2^{WT}$ -identifizierten Motive überrepräsentiert ist, aber beide trotzdem replizierbare Loci binden, zeigt eine gerichtete Veränderung durch die Mutationen, die sich im resultierenden Phänotypen nicht unterscheiden. Leider fehlen weitere Analysen, mit denen eine Hypothese zur Erklärung für diese unerwartete Beobachtung aufgestellt werden kann. Zunächst muss sicherlich geprüft werden, ob die DNA-Bindung der $MSX2$ -Mutationen im Zusammenhang mit der Überexpression der Konstrukte steht. Auch wenn noch nicht klar ist, wie die replizierbare DNA-Bindung zustande kommt, könnte die genauere Analyse der gebundenen Sequenzen es ermöglichen, unterschiedliche Aspekte der Funktionalität von $MSX2$ zu untersuchen.

Für weitere Analysen wurden zudem während dieser Arbeit ChIP-seq-Experimente mit Antikörpern gegen die H3K4-Trimethylierung, die auf eine aktive Transkription eines Promotors hindeuten, durchgeführt und stehen nun zur Auswertung zur Verfügung. Eine Änderung der Genregulation zwischen der Expression von Wildtyp und den Mutanten $MSX2^{L13P}$ und $MSX2^{R31H}$ ist auch in Hühner-Micromasskulturen offensichtlich; so sollten sich auch Unterschiede in der Methylierung von Promotoren zeigen lassen. Sollten z.B. die GC-reichen Motive in der L13P-ChIP-seq tatsächlich auf einer Veränderung der Bindung in Promotoren beruhen, könnte z.B. mit der Analyse dieser gebundenen Regionen begonnen und so überprüft werden, ob diese Beobachtung auch Auswirkungen auf die Genaktivität hat.

5.4.3 Die Mutation $MSX2^{P7H}$

Die ChIP-seq-Analysen der 3xFlag- $MSX2^{P7H}$ -Mutation zeigten eine sehr ähnliche Verteilung und Anreicherung von gebundenen Sequenzen zu 3xFlag- $MSX2$. Der Vergleich der Motivanalysen ergab, dass in 3xFlag- $MSX2^{P7H}$ -Bindestellen keine grundsätzlich anderen Motive angereichert werden. Die Auswirkung dieser Mutation auf die DNA-Bindung wurde bislang mittels EMSAs und radioaktiv-markierten Oligonukleotiden zufälliger Sequenz untersucht (Ma et al., 1996). Dies ergab, dass $Msx2^{P7H}$ das gleiche Konsensmotiv bindet wie $Msx2$, allerdings mit stärkerer Affinität. Die Art und Weise, wie Msx -Proteine Genregulation ausüben, ist bis heute nicht vollständig verstanden. Es ist bekannt, dass Msx -Proteine oftmals mit anderen Faktoren interagieren und damit indirekt die Genregulation beeinflussen (Newberry et al., 1997; Zhang et al., 1997).

Die Analyse dieser Mutation mittels ChIP-seq *in vivo* bringt neue Hinweise für das Verständnis des Pathomechanismus dieser Mutation. Die Ergebnisse deuten nicht darauf hin, dass MSX2^{P7H} einfach nur eine höhere Affinität zum MSX2-Konsensmotiv hat. Sollte das oben genannte Motiv CAAT(C|G)A(G|A) (Abbildung 5.3) tatsächlich ein durch MSX2 direkt gebundenes Motiv sein, würde MSX2^{P7H} dieses sogar weniger häufig binden.

Es scheint eher, als würde die Affinität zu Kofaktoren verändert sein, denn trotz einer ähnlich großen Anzahl von Peaks (gebundenen Sequenzen) für Wildtyp und Mutante unterscheidet sich die Zusammensetzung der Peaks. Neben dem oben genannten Motiv waren zwei weitere Motive, unter denen auch das Runx-Konsensmotiv ist, unter den stärksten Peaks in der Mutante ebenfalls weniger oft vertreten. Dafür wird das Konsensmotiv von AP1 bzw. Fos stärker angereichert als in MSX2^{WT}-gebundenen Sequenzen und ist das am häufigsten vertretene Motiv in den stärksten Peaks von MSX2^{P7H}.

Die hier in Wildtyp und Mutante ermittelten Motive könnten durch Kofaktor-Interaktionen mit MSX2^{WT} bzw. MSX2^{P7H} angereichert werden. Der N-Terminus der Homöodomäne, in der die P7H-Mutation liegt, war Focus in vielen Untersuchungen von Homöodomänen anderer Homöobox-Transkriptionsfaktoren. Da der N-Terminus die weniger stark konservierte Verlängerung der Homöodomäne ist, wird vermutet, dass er an der funktionellen Spezifität der DNA-Bindung verschiedener Homöoboxfaktoren eine wichtige Rolle spielt (Shang et al., 1994), und eine Mutation in dieser Domäne könnte diese Spezifität ändern. Dies könnte hier z.B. bedeuten, dass die Mutante P7H öfter in Interaktion mit z.B. AP1 an die DNA bindet als der Wildtyp.

Wie bereits erwähnt, wurde gezeigt, dass Prolin im N-Terminus eine Helix-Struktur initiieren kann (Richardson and Richardson, 1988). Der Verlust des Prolins im N-Terminus an letzter Position vor der Helix-I könnte somit Einfluss auf die Länge der Helix haben, wenn der Prolin-induzierte Knick am Übergang zum N-Terminus aufgehoben ist.

Es muss nun geprüft werden, ob MSX2^{P7H} tatsächlich Präferenzen in der Kofaktor-Interaktion hat und daher Kofaktor-Motive in zu MSX2 unterschiedlicher Häufigkeit anreichert. Dafür ist zu untersuchen, ob die Anreicherung der ermittelten Motive tatsächlich durch eine Interaktion mit MSX2 zustande kommt, und ob MSX2 für diese Interaktion ebenfalls selber DNA bindet. In dieser Arbeit wurde daher ein erster Ansatz entwickelt, um dies zu überprüfen (siehe Abschnitt 5.4.4).

Die Untersuchung der Kofaktor-abhängigen DNA-Bindung von MSX2 bzw. MSX2^{P7H} wäre auch ein wichtiger Ansatz zur Erklärung des Pathomechanismus bei der Entstehung der Craniosynostose. Es wird vermutet, dass dem Mechanismus eine veränderte Interaktion von Msx2^{P7H} und Runx2 zugrunde liegt (Shirakabe et al., 2001; Hjelmeland et al., 2005).

5.4.4 Identifikation von Interaktionspartnern durch ChIP-seq

ChIP-seq zur Untersuchung Kofaktor-abhängiger DNA-Interaktion

Es ist immer noch ungeklärt, wie Msx-Proteine physikalisch an der Genregulation beteiligt sind und in welcher Weise - und ob überhaupt - eine DNA-Bindung zwangsläufig involviert ist. Auch die Analyse der gebundenen Sequenzen in den hier generierten ChIP-seq-Daten lässt keine Antworten auf die Fragen zu, ob MSX2 vorwiegend direkt an die DNA bindet, oder ob es dies bevorzugt über die Interaktion mit Kofaktoren tut. Sollten die hier erfassten Peaks aus den ChIP-seq-Experimenten der L13P- und R31H-Mutationen tatsächlich ebenfalls durch Interaktionen mit Kofaktoren zustande kommen, könnte zumindest vermutet werden, dass für die Anreicherung der beobachteten Kofaktor-Motive in den MSX2- und MSX2^{P7H}-gebundenen Sequenzen eine direkte MSX2-DNA-Interaktion im Spiel war, und der beobachtete Unterschied in den Motiven durch den Verlust der direkten DNA-Bindung in den Mutationen eine Rolle spielt.

In dieser Arbeit wurde ein experimenteller Ansatz entwickelt, um weitere Einblicke in die Kofaktor-abhängige MSX2-DNA-Bindung mittels ChIP-seq-Analysen zu erhalten. Eines der überrepräsentierten Kofaktor-Motive entsprach der Erkennungssequenz von Runx2. Die Tatsache, dass das Runx-Motiv in MSX2-gebundenen Sequenzen angereichert ist, kann verschiedene Gründe haben. RUNX2 und MSX2 könnten abhängig oder unabhängig voneinander die gleichen regulatorischen Elemente binden. Um zwischen diesen zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde 3xFlag-MSX2 zusammen mit RUNX2 bzw. dem DNA-bindedefizienten RUNX2^{Q209R} koexprimiert (Abbildung 5.4). Wenn die Anreicherung des Runx-Motivs abhängig von der Interaktion zwischen RUNX2 und MSX2 sein sollte, sollte diese Motiv-Anreicherung in einer ChIP von MSX2 in Zellen, die auch RUNX2^{Q209R} koexprimieren, verloren gehen (verglichen mit der Koexpression von MSX2 und RUNX2-Wildtyp) (Abbildung 5.4 A und B). Da sowohl Msx2 als auch Msx2^{P7H} mit Runx2 in Zellkulturexperimenten interagieren (Shirakabe et al., 2001), könnte die Fähigkeit zur Interaktion mit Runx2 und im Zusammenhang mit der DNA-Interaktion analysiert werden.

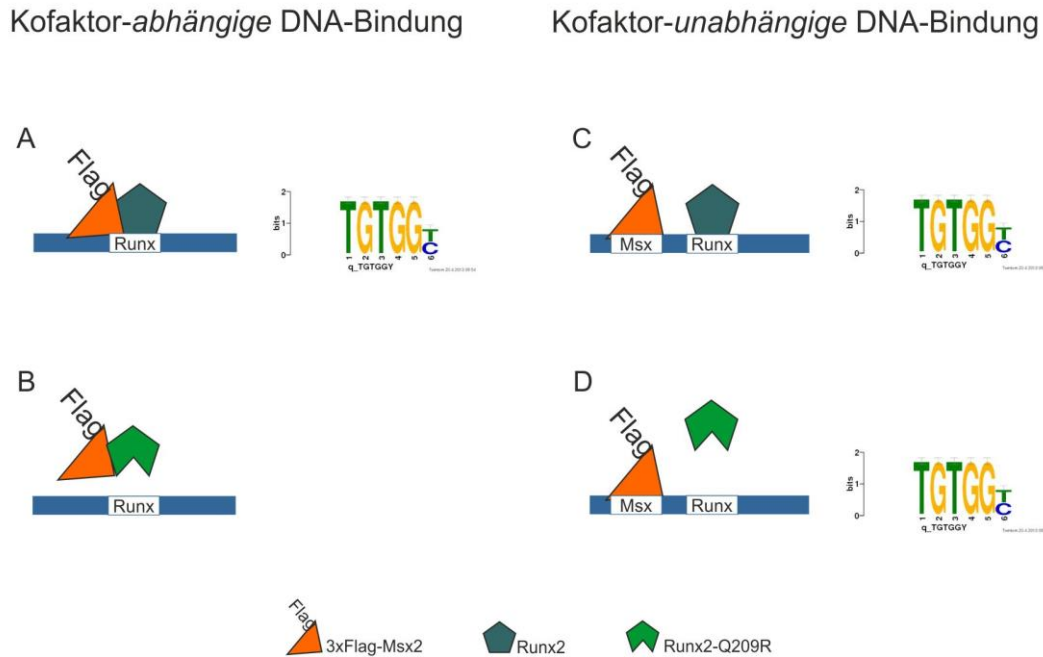


Abbildung 5.4 Schematische Darstellung zur Untersuchung der Msx2-Funktion während der DNA-Bindung. Dargestellt sind die möglichen Situationen an der DNA bei einer kofaktor-abhängigen (A und B), oder kofaktor-unabhängigen (C und D) DNA-Bindung durch Msx2. Sollte die Anreicherung eines Runx-Motivs abhängig von einer Msx2-Runx2-Interaktion sein (A), wird dieses Motiv durch eine Koexpression von 3xFlag-Msx2 und Runx^{2Q209R} nicht mehr verstärkt gebunden werden (B). Sollte das Runx-Motiv angereichert werden, weil Msx2 und Runx2 die gleichen cis-regulatorischen Bereiche binden, aber dies nicht durch eine Protein-Interaktion bedingt (C), würde das Runx2 Motiv auch in einer anti-Flag-ChIP von 3xFlag-Msx2 und Runx^{2Q209R} exprimierenden Zellen mit einer ähnlichen Häufigkeit beobachtet werden (D).

Soweit zeigen die ersten Analysen, dass die Koexpression von *RUNX2* und *MSX2*^{P7H} zu einer gesteigerten Anreicherung des Runx-Motivs führen. Es war das am meisten überrepräsentierte Motiv in den 5.000 stärksten *MSX2*^{P7H}-Peaks. Außerdem zeigte sich in den CentriMo-Analysen, dass das Runx-Motiv verstärkt in der Nähe des Msx-Motivs zu finden ist. Dies bestärkte die Hypothese einer Protein-DNA-Interaktion, die nicht nur an einzelnen Promotor relevant ist (wie es in Reporter-Experimenten gezeigt von Shirakabe et al., 2001 wurde) sondern auch genomweit von Bedeutung ist. Auf diese Weise könnte auch die Häufung anderer Kofaktor-Motive in den Msx-gebundenen Sequenzen überprüft werden.

ChIP-seq-Analyse einer Mutation in einer Protein-Interaktionsdomänen von TWIST2

Für die Erklärung genregulatorischer Prozesse durch Transkriptionsfaktoren bedarf es einem gesteigerten Verständnis von Protein-Protein-Interaktionen, da dies ein entscheidender Mechanismus der differentiellen Genregulation ist, wie sie *in vivo* beobachtet wird. Neben Msx2 interagiert auch der Transkriptionsfaktor Twist2 mit Runx2 (Bialek et al., 2004). Für ein

besseres Verständnis der Interaktion von Runx2 und Twist2 in der Genregulation sollte daher im Rahmen dieser Arbeit auch überprüft werden, ob sich Mutationen in Protein-Interaktionsdomänen von Transkriptionsfaktoren, die nur indirekt zur DNA-Erkennung beitragen, mittels ChIP-seq und in Hühner-Micromasskulturen untersuchen lassen. Die *missense*-Mutation S146P liegt in der Twistbox von TWIST2, eine bekannten Protein-Interaktionsdomäne. Die homologe Mutation S192P in der Twistbox von Twist1 führt heterozygot in Mäusen zu einer Craniosynostose und zudem zu einer geschwächten Interaktion mit Runx2 (Bialek et al., 2004). Die Twistbox des murinen Twist1 ist zu 100 Prozent konserviert mit der Twistbox von TWIST2 im Hühnchen. Die murinen Homologe Twist1 und Twist2 interagieren mit Runx2, und der Funktionsverlust von Twist1 und Twist2 in Mäusen führt zur Rettung des *Runx2*-heterozygoten Phänotyps in Mäusen (Bialek et al., 2004).

Im Falle einer mit ChIP-seq nachweisbaren Interaktion, wie sie etwa durch ko-angereicherte Motive nahegelegt wird, können dann weitere funktionelle Analysen in den Kontext gemeinsamer Funktionen von Runx2 und Twist2 eingebaut werden. So könnten weitere Einblicke in das genregulative Netzwerk der Knochenentwicklung gewonnen werden.

Die Expression von *3xFlag-TWIST2* in Hühner-Micromasskulturen inhibierte erwartungsgemäß deren Differenzierung. Im Vergleich dazu zeigte die Expression der S146P-Mutation keinen Unterschied zu TWIST2; sie inhibierte die Produktion von Knorpelmatrix sowie die Aktivität der Alkalischen Phosphatase gleichermaßen. Die Analyse der ChIP-seq-Experimente ergab, dass 98 Prozent der TWIST2^{S146P}-Peaks (dies entspricht 22.152 Peaks) mit denen von TWIST2^{WT} überlappen; dies könnte erklären, warum es keinen deutlichen Unterschied in den retroviral infizierten Kulturen gibt.

Wie erwartet zeigten sich auch keine Unterschiede in den primär gebundenen Motiven; dies war bei der Art der Mutation auch nicht anzunehmen. Beide binden hoch spezifisch das E-Box-Motiv CANNTG in der Doppelhelix. Die vermutete Konsequenz der Mutation S146P war, dass eventuell die Bindung zu RUNX2 geschwächt wird. Um eine mögliche Kofaktorfunktion genomweit zu überprüfen, wurden die zusammen mit dem E-Box-Motiv angereicherten Motive unter den stärksten gebundenen Sequenzen sowohl für TWIST2 als auch für TWIST2^{S146P} analysiert (Abbildung 4.33). Unter den Ergebnissen beider Analysen zeigte sich interessanterweise eine Anreicherung von Homöobox-Motiven, wie etwa der Transkriptionsfaktoren Foxo3 und den Homöoboxfaktoren Pdx1 und Prrx2 mit nur wenigen Basenpaaren Abstand zum E-Box-Motiv. In einer Studie zur Identifizierung von HoxA5-Kofaktoren wurde gezeigt, dass HoxA5 mit Twist1 interagiert (Stasinopoulos et al., 2005); dies ist ein erstes Indiz für mögliche Interaktionen von Twist-Proteinen mit Homöoboxfaktoren. Da viele Homöoboxproteine das gleiche TAAT-Motiv wie auch Pdx1 und Prrx2 binden, erlaubt diese Beobachtung vorläufig nur die Annahme, dass sich unter den TWIST2-Kofaktoren auch

Homeoboxfaktoren befinden könnten und erlaubt keine genaue Aussage über das tatsächlich interagierende Protein.

Unter den Sequenzanalysen zeigte sich auch die Anreicherung des Runx-Motivs. Der direkte Vergleich der ko-angereicherten Motive in den 5.000 stärksten TWIST2^{WT}-gebundenen Sequenzen relativ zu den ko-angereicherten Motiven der 5.000 stärksten TWIST2^{S146P}-gebundenen Sequenzen ergab den größten Unterschied für die Häufigkeit des Runx-Konsensmotivs: Der maximale Unterschied zeigte sich etwa 30 bp vor der TWIST2-Bindestelle, wo es sich signifikant häufiger ermittelt wurde als im selben Abstand vor der TWIST2^{S146P}-Bindestelle vertreten (Abbildung 4.34). Dies könnte darauf hin deuten, dass das substituierte Serin in der Twistbox auch in TWIST2 und im Hühnchen zu einer geschwächten Interaktion mit RUNX2 führt und daher eine Anreicherung zusammen mit dem E-Box-Motiv seltener beobachtet wird. Allerdings wurde ein zu Runx ähnliches Motiv unmittelbar im Zentrum der Sequenzen und häufiger in den TWIST2^{S146P}-Peaks gefunden, allerdings auch mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit. Dies könnte daher rühren, dass z.B. das Motiv der Heterodimere Tal1:TCF3 (Abbildung 4.33 C), welches stark im Zentrum der Sequenzen angereichert ist, teilweise ein Runx-Motiv enthält. Die geringere Wahrscheinlichkeit für die Anreicherung an dieser Position liegt wahrscheinlich daran, dass die dort angereicherte Sequenz nur teilweise und weniger schlecht mit der Runx-Konsenssequenz übereinstimmt.

Im Vergleich der beiden ChIP-seq-Experimente gab es einige Peaks oberhalb einer IDR von 0.01, die in TWIST2^{WT}-, aber nicht in TWIST2^{S146P}-ChIP-seq-Experimenten vorkamen (individuelle Peaks). So wurden noch zusätzlich die Motive in den TWIST2^{WT}-Sequenzen gesucht, die signifikant häufiger auftreten als in den Sequenzen der individuellen TWIST2^{S146P}-Peaks. Das Ergebnis zeigte drei Motive mit einer Ähnlichkeit zu bekannten Motiven anderer Transkriptionsfaktoren. Unter ihnen war auch das Konsens-Motiv von Runx; dieses kam von den ermittelten Motiven am häufigsten in den individuellen TWIST2-Peaks vor und ist ein weiteres Indiz dafür, dass TWIST2 relativ zur Mutante öfter Sequenzen bindet, die auch ein Runx-Motiv enthalten. Ein weiteres Motiv hatte Ähnlichkeit zu dem Motiv von ZEB1. ZEB1 spielt wie auch Twist-Proteine eine Rolle in der epithelialen-zu-mesenchymalen Transition und ist ebenfalls in der Lage, das E-Box-Motiv zu binden (Park et al., 2008). Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion von ZEB1 mit E-Box-bindenden Transkriptionsfaktoren wie den Twist-Proteinen sein.

Die TWIST2-Mutation S146P bindet wie gezeigt nahezu identische Regionen wie der Wildtyp. Die beobachteten Unterschiede bzgl. der Anreicherung von Kofaktor-Motiven wurde durch Motivanalysen der am häufigst gebundenen Regionen durchgeführt und konnte nicht für die Gesamtzahl der reproduzierten Peaks bestätigt werden. Es bedarf hier noch weiteren und verfeinerten bioinformatischen Analysen um die hier angedeuteten Unterschiede der Motivanalysen zu bestätigen. So zeigten die ChIP-seq Experimente eine sehr hohe

Replizierbarkeit, sowohl in der Verteilung der Bindestellen, als auch in der Stärke der Fragmentanreicherungen in den Peaks, die durchgeführten Replikaten nahezu identisch war. Dies sollte ermöglichen, unterschiedliche Affinitäten von TWIST2^{WT} und TWIST2^{S146P} zu Sequenzen und Motiven zu ermitteln. So könnten selbst schwache Effekte durch die Mutation ermittelt werden, als auch funktionsabhängige Motiverkennung untersucht werden.

Ausblick zu weiteren Untersuchungen der RUNX2-DNA-Interaktion

Die Ergebnisse der RUNX2-ChIP-seq zeigten die Bindung von vielen tausenden DNA-Sequenzen. Wie bereits erwähnt, ist die Identifizierung von regulierten Genen auf Grund von ChIP-seq-Ergebnissen schwierig. Daher wurde hier über eine Möglichkeit nachgedacht, die RUNX2-DNA-Bindung besser zu verstehen und den Informationsgehalt der ChIP-seq zu vergrößern. Mutationen, die die DNA-Bindung von Transkriptionsfaktoren nicht schwächen, eignen sich verständlicherweise besser für die ChIP-Experimente. Erwähnt wurde zu Beginn eine gut untersuchte Domäne im N-Terminus von Runx2 mit dem Namen *nuclear-matrix-targeting-signal (NMTS)*. Diese interagiert mit Kofaktoren an der nukleären Matrix in Transkriptionsfaktor-Komplexen, um die Genregulation zu kontrollieren. Es gibt viele Untersuchungen zu dieser Domäne, und so ist sie neben der runt-Domäne die einzige, deren Tertiärstruktur aufgeklärt wurde. Daher wurde in dieser Arbeit die NMTS-Domäne deletiert und kann nun für ChIP-seq-Experimente eingesetzt werden, um herauszufinden, inwiefern die Funktion dieser Domäne die DNA-bindende-Spezifität von RUNX2 beeinflusst.

5.4.5 Analyse von Transkriptionsfaktoren mittels ChIP-seq – ein Resümee

Identifikation von Zielgenen mittels ChIP-seq

Mittels ChIP-seq wurden in dieser Arbeit tausende genomweite Bindestellen für RUNX2, MSX2 und TWIST2 identifiziert. Die Analyse der gebunden Sequenzen von MSX2 zeigte eine Anreicherung des Runx-Motivs und bringt einen ersten Anhaltspunkt für eine genomweite Interaktion von MSX2 und RUNX2 in der Genregulation.

In einem ersten Ansatz wurde versucht, ChIP-seq auch als funktionellen Nachweis einer Protein-Interaktion zwischen MSX2 und RUNX2 zu nutzen. Dies zeigte, dass die Interaktion von MSX2 und RUNX2 vermutlich notwendig ist, damit MSX2 bestimmte Zielsequenzen bindet und könnte ein Ansatz sein, den Mechanismus der MSX2-abhängigen Genregulation besser zu verstehen.

Der Vergleich von MSX2- und RUNX2-gebundenen Sequenzen zeigte, dass diese in hier durchgeführten ChIP-seq-Experimenten 1.794 gemeinsame Zielsequenzen binden, von denen

748 sich in der Nähe von Promotoren befinden. Zu diesen gehörten auch der Promotor von *NOTCH2* und eine konservierte Region in der Nähe des *HEY1*-Transkriptionsstarts. Funktionelle Analysen dieser beiden potentiellen Zielgene ergaben, dass *MSX2* und *RUNX2* diese gegenläufig regulieren und *MSX2* sogar direkt an den *NOTCH2*-Promotor bindet und damit das Potential hat, diesen auch *in vivo* zu regulieren. Der Notch-Signalweg wurde bereits in die Regulation von *Runx2* involviert. Die Ergebnisse dieser Arbeit bringen einen ersten Beweis für einen *Feedback-Loop* von *Runx2* zum Notch-Signalweg, vermutlich auch durch die direkte Inhibition des Notch-Effektors *HEY1*. Als ein weiteres potentielles Zielgen von *RUNX2* wurde *CADHERIN 2* identifiziert. Die wahrscheinlich positive Regulation von *CADHERIN 2* durch *RUNX2* könnte zudem in einem wichtigen Zusammenhang der Motilität von Zellen während der Entstehung von Metastasen stehen.

Insgesamt zeigt sich allerdings, dass die Identifikation tausender Zielsequenzen in ChIP-seq-Experimenten die Ermittlung einzelner potentieller Zielgene erschwert, bedenkt man die Relation von identifizierten Zielsequenzen und verifizierten Zielgenen. Die ermittelten Zielsequenzen können in der Nähe von Genen aber auch oftmals weit entfernt vom nächsten annotierten Gen liegen. Der Nachweis einer regulatorischen Funktion, insbesondere von weit entfernt liegenden Transkriptionsfaktorbindestellen auf ein bestimmtes Gen, erfordert weitere Experimente, beispielsweise der *Chromatin-Conformation-Capture*-Techniken, und letztlich auch genetische Manipulationen im Tiermodell. Für die Selektion von potentiell regulierten Zielgenen wurden daher nur Promotor-nahe Peaks in Betracht gezogen, da eine Promotor-nahe Bindung wahrscheinlicher die Regulation dieses Gens beeinflusst als eine Bindung, die sehr weit entfernt ist. Allerdings lässt sich über die räumliche Distanz zweier chromosomaler Loci mittels ChIP-seq keine Aussage treffen und eine Promotor-fern gebundene Sequenz könnte durch unterschiedliche Konformationen des Chromatins *in vivo* viel näher am Transkriptionsstart liegen als ein Promotor-naher Peak. Da diese Chromatinkonformationen in den meisten Reporter-Untersuchungen zur Verifizierung von gebundenen Sequenzen einer ChIP-seq nicht nachgeahmt werden können, bedeutet ein negatives Ergebnis eines Validierungsexperiments noch nicht, dass keine Interaktion vorliegt. Die Ermittlung von Transkriptionsfaktorbindestellen mittels ChIP-seq ergibt ein Abbild der *in-vivo*-Situation; dies ist ein entscheidender Vorteil. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Vergleich zweier potentiell interagierender Faktoren die Identifikation relevanter Zielgene erleichtern kann. Für die Identifizierung von Zielgenen ist es jedoch vermutlich ebenfalls sehr hilfreich, ChIP-seq in Kombination mit weiteren Techniken, wie etwa der genomweiten Analyse der Chromatinkonformation (HiC), zu nutzen.

Vergleichende Analysen von Transkriptionsfaktoren und deren Mutationen

ChIP-seq-Analysen wurden im Rahmen dieser Arbeit neben der Identifikation von Zielgenen auch als Werkzeug benutzt, um die Auswirkung von *missense*-Mutationen in DNA-bindenden und Protein-Protein-Interaktionsdomänen von Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

Die MSX2-Mutationen L13P und R31H, die nach bisherigen Annahmen zum Verlust der DNA-Bindung führen, zeigten, dass diese Mutationen trotzdem noch in der Lage sind, mit spezifischen Sequenzen im Genom zu interagieren und reproduzierbar an DNA zu binden. Die Tatsache, dass sich die DNA-Interaktion für beide Mutationen unterscheidet, bringt neue Ansatzpunkte zur Untersuchung der MSX2-Funktion und des Pathomechanismus der Mutationen. In Kombination mit ChIP-seq-Experimenten von verschiedenen Histonmodifizierungen können zudem die Funktionen der von den Mutanten gebundenen Sequenzen näher untersucht werden und so Hinweise auf die Auswirkungen der Bindung auf die Genregulation erhalten werden.

Für die MSX2^{P7H}-Mutation konnten Veränderungen in der Affinität zu Kofaktoren identifiziert werden. Die bisherige Hypothese, dass diese Mutation einzig zu einer stärkeren Bindung des Msx2-Motivs führt, konnte hier nicht bestätigt werden. Dies zeigt, dass mittels ChIP-seq ein viel umfassenderes Bild von Veränderungen durch Mutationen erstellt wird, und liefert Ansatzpunkte weiterer Untersuchungen der MSX2-DNA-Bindung durch Kofaktoren. Das hier vorgeschlagene Modell zur Untersuchung Kofaktor-abhängiger DNA-Bindung kann möglicherweise auch für weitere Untersuchung der MSX2^{P7H}-Mutation zum Einsatz kommen. Die Tatsache, dass sich auch eine *missense*-Mutation in der RUNX2-Interaktionsdomäne von TWIST2 in den Ergebnissen der ChIP-seq abzeichnet, unterstützt ein weiteres Mal das Potential, ChIP-seq für die Untersuchung Kofaktor-abhängiger DNA-Bindung zu verwenden und liefert ein weiteres Hilfsmittel zur Untersuchung komplexer genregulatorischer Netzwerke und Mechanismen.

6 Zusammenfassung

Die Chromatin-Immunpräzipitation mit nachfolgender Sequenzierung der gefällten Fragmente mittels Next-Generation Sequencing-Technologien (ChIP-seq) hat sich in den letzten Jahren zu einem wichtigen Werkzeug entwickelt, um genomweite *in vivo* DNA-Interaktionen von Transkriptionsfaktoren zu detektieren. Zum einen können Zielgene eines Transkriptionsfaktors identifiziert werden, zum anderen aber auch vergleichende Untersuchungen der DNA-Bindung durch verschiedene Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Die Durchführung und Auswertung von ChIP-seq-Experimenten unterliegen jedoch immer noch einigen Begrenzungen, wie die Verfügbarkeit ausreichend spezifischer und affiner Antikörper für den gewünschten Transkriptionsfaktor, und die Auswertung und weitere Analyse tausender potentieller Bindestellen.

Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Modellsystem erarbeitet, um die Vorteile von ChIP-seq-Analysen effizient zu nutzen. In Hühner-Micromasskulturen wurden drei jeweils mit einem FLAG-Epitop versehene Transkriptionsfaktoren exprimiert und deren Bindungsstellen identifiziert. Hierfür wurden die Transkriptionsfaktoren RUNX2, MSX2 und TWIST2 gewählt, die alle drei eine essentielle Rolle in der Skelettentwicklung haben und Teil des gleichen genregulativen Netzwerkes sind. Dabei konnte das potentielle RUNX2-Zielgen CADHERIN2 bestätigt werden. Außerdem konnte der Notch-Signalweg als möglicher Schnittpunkt der Msx2- und Runx2-Regulationsnetzwerke identifiziert werden, der vermutlich über die Regulation von *Notch2* und *Hey1* gesteuert wird. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Hühner-Micromasskulturen ein gutes Modellsystem darstellen, das trotz Überexpression von Faktoren die Identifizierung und Untersuchung relevanter Zielgene ermöglicht und damit ein sehr geeignetes System für Primäranalysen mittels ChIP-seq darstellt. Weiterhin konnten die Interaktion von MSX2 und RUNX2 sowie die primär Kofaktor-abhängige DNA-Bindung von MSX2 auf genomweiter Ebene bestätigt werden. Daher wurde zudem eine Möglichkeit erarbeitet, die MSX2-DNA-Interaktion über Kofaktoren weiterführend mittels ChIP-seq zu untersuchen. Durch ChIP-seq-Analysen von MSX2 und drei humangenetisch relevanten Mutationen in der Msx2-Homöodomäne konnten neue Einblicke auf die Eigenschaften der Mutationen gewonnen werden. So deuten die Ergebnisse der Analyse der Mutation MSX2^{P7H} auf eine veränderte Affinität zu potentiellen Kofaktoren hin. Dieses Ergebnis, sowie die Untersuchung der Twist2^{S146P}-Mutation in der Runx-interagierenden Twistbox zeigten, dass ChIP-seq nicht nur die Möglichkeit bietet, die direkte DNA-Interaktion zu untersuchen, sondern auch Aufschlüsse über Kofaktor-Interaktionen zu geben. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Methode der ChIP-seq einen umfassenden Einblick in die *in vivo* Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren und die Effekte von Transkriptionsfaktormutationen bietet.

7 Summary

Chromatin immunoprecipitation followed by next-generation-sequencing (ChIP-seq) of precipitated fragments has become an important tool to study transcription factor-DNA-interactions in a genome wide scale and *in vivo*. It is utilized mainly to identify target genes of individual transcription factors, but also to compare the binding patterns of several related transcription factors. However, performing and evaluating ChIP-seq experiments is challenging for multiple reasons. Antibody availability and specificity is still a major limitation leading to low enrichment of transcription factor-bound DNA or crossreactivity with other proteins than the targeted transcription factor.

To utilize the advantages of ChIP-seq for the investigation of the gene regulatory network of chondrogenic and osteogenic differentiation, a model system has been set up in a biological relevant cell culture system: ChIP-seq was performed in chicken micromass cultures overexpressing FLAG-tagged versions of the transcription factors RUNX2, MSX2 and TWIST2. All three of them are part of the same gene regulatory network.

Using ChIP-seq, the potential RUNX2 target gene CADHERIN2 could be verified. Furthermore the Notch signaling pathway was identified as a potential point of intersection of Msx2 and Runx2 function in skeletal differentiation, presumably by regulating both *Notch2* and *Hey1* proteins. This also proved the chicken micromass culture as well-suited model system for identifying biological relevant target genes as well as performing functional assays with identified genes. It can be therefore used efficiently to implement primary ChIP-seq analysis. ChIP-seq experiments validated the protein-protein interaction of MSX2 and RUNX2 in a genome wide scale and found clear indications of cofactor-dependent DNA-binding of MSX2. Moreover, a method has been established to further study the MSX2-DNA-interaction via cofactors using ChIP-seq in micromass cultures that coexpress both MSX2 and RUNX2 and that now can be used together with further potential cofactors of MSX2.

Analyzing ChIP-seq results of MSX2 and three disease-causing missense mutations in the Msx2-homeodomain brought new insights into the binding characteristics of these mutations: Motif analysis of MSX2^{P7H} bound sequences points towards altered affinity in cofactor-dependent DNA-binding. Similar results were found for the TWIST2 variant TWIST2^{S146P}, which carries a missense mutation in the Runx2-interacting twistbox. Both findings demonstrate that ChIP-seq can also deliver insights into cofactor-dependent DNA-interactions of the ChIP-ed transcription factor. In conclusion, the ChIP-seq approach applied here clearly illustrates that ChIP-seq can be used to gain insights into the *in vivo* characteristics of transcription factor DNA-binding and consequences of transcription factor mutations.

8 Literaturverzeichnis

- Akiyama, H, Kim, J-E, Nakashima, K, Balmes, G, Iwai, N, Deng, JM, Zhang, Z, Martin, JF, Behringer, RR, Nakamura, T, De Crombrugge, B. 2005. Osteo-chondroprogenitor cells are derived from Sox9 expressing precursors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 14665–70.
- Ali, S a, Zaidi, SK, Dobson, JR, Shakoori, AR, Lian, JB, Stein, JL, Van Wijnen, AJ, Stein, GS. 2010. Transcriptional corepressor TLE1 functions with Runx2 in epigenetic repression of ribosomal RNA genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 4165–9.
- Artavanis-Tsakonas, S. 1999. Notch Signaling: Cell Fate Control and Signal Integration in Development. *Science* 284: 770–776.
- Bailey, TL. 2011. DREME: motif discovery in transcription factor ChIP-seq data. *Bioinformatics (Oxford, England)* 27: 1653–9.
- Bailey, TL, Machanick, P. 2012. Inferring direct DNA binding from ChIP-seq. *Nucleic acids research* 40: e128.
- Barski, A, Zhao, K. 2009. Genomic location analysis by ChIP-Seq. *Journal of cellular biochemistry* 107: 11–8.
- Berger, MF, Badis, G, Gehrke, AR, Talukder, S, Philippakis, A a, Peña-Castillo, L, Alleyne, TM, Mnaimneh, S, Botvinnik, OB, Chan, ET, Khalid, F, Zhang, W, Newburger, D, Jaeger, S a, Morris, QD, Bulyk, ML, Hughes, TR. 2008. Variation in homeodomain DNA binding revealed by high-resolution analysis of sequence preferences. *Cell* 133: 1266–76.
- Bialek, P, Kern, B, Yang, X, Schrock, M, Sosic, D, Hong, N, Wu, H, Yu, K, Ornitz, DM, Olson, EN, Justice, MJ, Karsenty, G, Jolla, L, Louis, S. 2004. A Twist Code Determines the Onset of Osteoblast Differentiation Bone Disease Program of Texas. 6: 423–435.
- Billeter, M. 1996. Homeodomain-type DNA recognition. *Progress in biophysics and molecular biology* 66: 211–225.
- Bray, SJ. 2006. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature reviews. Molecular cell biology* 7: 678–89.
- Chimge, N-O, Baniwal, SK, Little, GH, Chen, Y, Kahn, M, Tripathy, D, Borok, Z, Frenkel, B. 2011. Regulation of breast cancer metastasis by Runx2 and estrogen signaling: the role of SNAI2. *Breast cancer research : BCR* 13: R127.
- Crowe, R, Henrique, D, Ish-Horowicz, D, Niswander, L. 1998. A new role for Notch and Delta in cell fate decisions: patterning the feather array. *Development (Cambridge, England)* 125: 767–75.
- Crowe, R, Zikherman, J, Niswander, L. 1999. Delta-1 negatively regulates the transition from prehypertrophic to hypertrophic chondrocytes during cartilage formation. *Development (Cambridge, England)* 126: 987–98.

- D'Elia, a V, Tell, G, Paron, I, Pellizzari, L, Lonigro, R, Damante, G. 2001. Missense mutations of human homeoboxes: A review. *Human mutation* 18: 361–74.
- Van der Deen, M, Akech, J, Lapointe, D, Gupta, S, Young, DW, Montecino, M a, Galindo, M, Lian, JB, Stein, JL, Stein, GS, Van Wijnen, AJ. 2012. Genomic promoter occupancy of runt-related transcription factor RUNX2 in Osteosarcoma cells identifies genes involved in cell adhesion and motility. *The Journal of biological chemistry* 287: 4503–17.
- Dishowitz, MI, Terkhorn, SP, Bostic, S a, Hankenson, KD. 2012. Notch signaling components are upregulated during both endochondral and intramembranous bone regeneration. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 30: 296–303.
- Dodig, M, Tadic, T, Kronenberg, MS, Dacic, S, Liu, YH, Maxson, R, Rowe, DW, Lichtler, a C. 1999. Ectopic Msx2 overexpression inhibits and Msx2 antisense stimulates calvarial osteoblast differentiation. *Developmental biology* 209: 298–307.
- Dolfini, D, Zambelli, F, Pavesi, G, Mantovani, R. 2009. A perspective of promoter architecture from the CCAAT box. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8: 4127–37.
- Dong, Y, Jesse, AM, Kohn, A, Gunnell, LM, Honjo, T, Zuscik, MJ, O'Keefe, RJ, Hilton, MJ. 2010. RBPjkappa-dependent Notch signaling regulates mesenchymal progenitor cell proliferation and differentiation during skeletal development. *Development (Cambridge, England)* 137: 1461–71.
- Ducy, P, Zhang, R, Geoffroy, V, Ridall, a L, Karsenty, G. 1997. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89: 747–54.
- Elkon, R, Linhart, C, Sharan, R, Shamir, R, Shiloh, Y. 2003. Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells. *Genome research* 13: 773–80.
- Fortini, ME. 2009. Notch signaling: the core pathway and its posttranslational regulation. *Developmental cell* 16: 633–47.
- Garcia-Miñaur, S, Mavrogiannis, L a, Rannan-Eliya, S V, Hendry, M a, Liston, W a, Porteous, MEM, Wilkie, AOM. 2003. Parietal foramina with cleidocranial dysplasia is caused by mutation in MSX2. *European journal of human genetics : EJHG* 11: 892–5.
- Garg, V. 2006. Molecular genetics of aortic valve disease. *Current opinion in cardiology* 21: 180–4.
- Gehring, WJ, Affolter, M, Bürglin, T. 1994a. Homeodomain proteins. *Annual review of biochemistry* 63: 487–526.
- Gehring, WJ, Schier, F, Resendez-perez, IID, Affolter, M, Otting, G, Wiithricht, K. 1994b. Homeodomain-DNA Recognition Review. 79: 211–223.
- Geoffroy, V, Ducy, P, Karsenty, G. 1995. A PEBP2 alpha/AML-1-related factor increases osteocalcin promoter activity through its binding to an osteoblast-specific cis-acting element. *The Journal of biological chemistry* 270: 30973–9.
- Gerstein, MB, Kundaje, A, Hariharan, M, Landt, SG, Yan, K-K, Cheng, C, Mu, XJ, Khurana, E, Rozowsky, J, Alexander, R, Min, R, Alves, P, Abyzov, A, Addleman, N, Bhardwaj, N, Boyle, AP, Cayting, P, Charos, A, Chen, DZ, Cheng, Y, Clarke, D, Eastman, C, Euskirchen, G, Fietze, S, Fu, Y, Gertz, J, Grubert, F, Harmanci, A, Jain, P, Kasowski, M, Lacroute, P, Leng, J, Lian, J, Monahan, H, O'Geen, H, Ouyang, Z, Partridge, EC, Patacsil, D, Pauli, F, Raha, D, Ramirez, L, Reddy, TE, Reed, B, Shi, M, Slifer, T, Wang, J, Wu, L, Yang, X, Yip, KY,

- Zilberman-Schapira, G, Batzoglou, S, Sidow, A, Farnham, PJ, Myers, RM, Weissman, SM, Snyder, M. 2012. Architecture of the human regulatory network derived from ENCODE data. *Nature* 489: 91–100.
- El Ghouzzi, V, Legeai-Mallet, L, Benoist-Lasselín, C, Lajeunie, E, Renier, D, Munnich, a, Bonaventure, J. 2001. Mutations in the basic domain and the loop-helix II junction of TWIST abolish DNA binding in Saethre-Chotzen syndrome. *FEBS letters* 492: 112–8.
- El Ghouzzi, V, Le Merrer, M, Perrin-Schmitt, F, Lajeunie, E, Enit, P, Enie, D, Burgeois, Patrice; Bonaventure, J. 1997. Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzene syndrome. *Nature genetics* 15: 42–46.
- Gilbert, S. 2006. *Developmental Biology*, 8e. Sinauer Associates Inc.
- Gripp, K, Zackai, E, Stolle, C. 2000. Mutations in the human TWIST gene. *Human mutation* 15: 150–5.
- Guntur, AR, Rosen, CJ, Naski, MC. 2012. N-cadherin adherens junctions mediate osteogenesis through PI3K signaling. *Bone* 50: 54–62.
- Gupta, S, Stamatoyannopoulos, J a, Bailey, TL, Noble, WS. 2007. Quantifying similarity between motifs. *Genome biology* 8: R24.
- Han, J, Ishii, M, Bringas, P, Maas, RL, Maxson, RE, Chai, Y. 2007. Concerted action of Msx1 and Msx2 in regulating cranial neural crest cell differentiation during frontal bone development. *Mechanisms of development* 124: 729–45.
- Hartmann, C, Tabin, CJ. 2000. Dual roles of Wnt signaling during chondrogenesis in the chicken limb. *Development (Cambridge, England)* 127: 3141–59.
- Hecht, J. 2006. Genexpressionsanalysen zum besseren Verständnis von Knochenheilung und -entwicklung. Dissertation.
- Hecht, J, Seitz, V, Urban, M, Wagner, F, Robinson, PN, Stiege, a, Dieterich, C, Kornak, U, Wilkening, U, Brieske, N, Zwingman, C, Kidess, a, Stricker, S, Mundlos, S. 2007. Detection of novel skeletogenesis target genes by comprehensive analysis of a Runx2(-/-) mouse model. *Gene expression patterns : GEP* 7: 102–12.
- Hilton, MJ, Tu, X, Wu, X, Bai, S, Zhao, H, Kobayashi, T, Kronenberg, HM, Teitelbaum, SL, Ross, FP, Kopan, R, Long, F. 2008. Notch signaling maintains bone marrow mesenchymal progenitors by suppressing osteoblast differentiation. *Nature medicine* 14: 306–14.
- Hjelmeland, AB, Schilling, SH, Guo, X, Quarles, D, Wang, X. 2005. Loss of Smad3-Mediated Negative Regulation of Runx2 Activity Leads to an Alteration in Cell Fate Determination. 25: 9460–9468.
- Hovde, S, Abate-Shen, C, Geiger, JH. 2001. Crystal structure of the Msx-1 homeodomain/DNA complex. *Biochemistry* 40: 12013–21.
- Hughes, SH. 2004. The RCAS vector system. *Folia biologica* 50: 107–19.
- Hughes, SH, Greenhouse, JJ, Petropoulos, CJ, Suttrave, P. 1987. Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors. *Journal of virology* 61: 3004–12.

- Ishii, M, Merrill, AE, Chan, Y-S, Gitelman, I, Rice, DPC, Sucov, HM, Maxson, RE. 2003. Msx2 and Twist cooperatively control the development of the neural crest-derived skeletogenic mesenchyme of the murine skull vault. *Development (Cambridge, England)* 130: 6131–42.
- Jabs, EW, Müller, U, Li, X, Ma, L, Luo, W, Haworth, IS, Klisak, I, Sparkes, R, Warman, ML, Mulliken, JB. 1993. A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis. *Cell* 75: 443–50.
- Javed, a, Guo, B, Hiebert, S, Choi, JY, Green, J, Zhao, SC, Osborne, M a, Stifani, S, Stein, JL, Lian, JB, Van Wijnen, a J, Stein, GS. 2000. Groucho/TLE/R-esp proteins associate with the nuclear matrix and repress RUNX (CBF(alpha)/AML/PEBP2(alpha)) dependent activation of tissue-specific gene transcription. *Journal of cell science* 113 (Pt 1: 2221–31.
- Javed, A, Barnes, GL, Pratap, J, Antkowiak, T, Gerstenfeld, LC, Van Wijnen, AJ, Stein, JL, Lian, JB, Stein, GS. 2005. Impaired intranuclear trafficking of Runx2 (AML3/CBFA1) transcription factors in breast cancer cells inhibits osteolysis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 1454–9.
- Jolma, A, Yan, J, Whittington, T, Toivonen, J, Nitta, KR, Rastas, P, Morgunova, E, Enge, M, Taipale, M, Wei, G, Palin, K, Vaquerizas, JM, Vincentelli, R, Luscombe, NM, Hughes, TR, Lemaire, P, Ukkonen, E, Kivioja, T. 2013. Resource DNA-Binding Specificities of Human Transcription Factors. 327–339.
- Jumlongras, D, Bei, M, Stimson, JM, Wang, WF, DePalma, SR, Seidman, CE, Felbor, U, Maas, R, Seidman, JG, Olsen, BR. 2001. A nonsense mutation in MSX1 causes Witkop syndrome. *American journal of human genetics* 69: 67–74.
- Kamachi, Y, Ogawa, E, Asano, M, Ishida, S, Murakami, Y, Satake, M, Ito, Y, Shigesada, K. 1990. Purification of a mouse nuclear factor that binds to both the A and B cores of the polyomavirus enhancer. *Journal of virology* 64: 4808–19.
- Kamath, BM, Stolle, C, Bason, L, Colliton, RP, Piccoli, D a, Spinner, NB, Krantz, ID. 2002. Craniosynostosis in Alagille syndrome. *American journal of medical genetics* 112: 176–80.
- Katoh, M, Katoh, M. 2009. Transcriptional mechanisms of WNT5A based on NF- κ B, Hedgehog, TGF β , and Notch signaling cascades. *International Journal of Molecular Medicine* 23: 763–769.
- Kharchenko, P, Tolstorukov, M, Park, P. 2008. Design and analysis of ChIP-seq experiments for DNA-binding proteins. *Nature biotechnology* 26: 1351–1359.
- Kim, JB, Islam, S, Kim, YJ, Prudoff, RS, Sass, KM, Wheelock, MJ, Johnson, KR. 2000. N-Cadherin extracellular repeat 4 mediates epithelial to mesenchymal transition and increased motility. *The Journal of cell biology* 151: 1193–206.
- Kim, MK, Kang, YK. 1999. Positional preference of proline in alpha-helices. *Protein science: a publication of the Protein Society* 8: 1492–9.
- Kissinger, CR, Liu, BS, Martin-Blanco, E, Kornberg, TB, Pabo, CO. 1990. Crystal structure of an engrailed homeodomain-DNA complex at 2.8 Å resolution: a framework for understanding homeodomain-DNA interactions. *Cell* 63: 579–90.
- Kohn, A, Dong, Y, Mirando, AJ, Jesse, AM, Honjo, T, Zuscik, MJ, O’Keefe, RJ, Hilton, MJ. 2012. Cartilage-specific RBPjk-dependent and -independent Notch signals regulate cartilage and bone development. *Development (Cambridge, England)* 139: 1198–212.

- Komori, T, Kishimoto, T. 1998. Cbfa1 in bone development. *Current opinion in genetics & development* 8: 494–9.
- Komori, T, Yagi, H, Nomura, S, Yamaguchi, A, Sasaki, K, Deguchi, K, Shimizu, Y, Bronson, R., Gao, Y-H, Inada, M, Sato, M, Okamoto, R, Kitamura, Y, Yoshiki, S, Kishimoto, T. 1997. Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell* 89: 755–764.
- Landt, SG, Marinov, GK, Kundaje, A, Kheradpour, P, Pauli, F, Batzoglou, S, Bernstein, BE, Bickel, P, Brown, JB, Cayting, P, Chen, Y, DeSalvo, G, Epstein, C, Fisher-Aylor, KI, Euskirchen, G, Gerstein, M, Gertz, J, Hartemink, AJ, Hoffman, MM, Iyer, VR, Jung, YL, Karmakar, S, Kellis, M, Kharchenko, P V, Li, Q, Liu, T, Liu, XS, Ma, L, Milosavljevic, A, Myers, RM, Park, PJ, Pazin, MJ, Perry, MD, Raha, D, Reddy, TE, Rozowsky, J, Shores, N, Sidow, A, Slattery, M, Stamatoyannopoulos, J a, Tolstorukov, MY, White, KP, Xi, S, Farnham, PJ, Lieb, JD, Wold, BJ, Snyder, M. 2012. ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. *Genome research* 22: 1813–31.
- Lee, D-S, Park, J-T, Kim, H-M, Ko, JS, Son, H-H, Gronostajski, RM, Cho, M-I, Choung, P-H, Park, J-C. 2009. Nuclear factor I-C is essential for odontogenic cell proliferation and odontoblast differentiation during tooth root development. *The Journal of biological chemistry* 284: 17293–303.
- Lee, D-S, Yoon, W-J, Cho, ES, Kim, H-J, Gronostajski, RM, Cho, M-I, Park, J-C. 2011. Crosstalk between nuclear factor I-C and transforming growth factor- β 1 signaling regulates odontoblast differentiation and homeostasis. *PloS one* 6: e29160.
- Lehmann, K, Seemann, P, Stricker, S, Sammar, M, Meyer, B, Süring, K, Majewski, F, Tinschert, S, Grzeschik, K-H, Müller, D, Knaus, P, Nürnberg, P, Mundlos, S. 2003. Mutations in bone morphogenetic protein receptor 1B cause brachydactyly type A2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 12277–82.
- Leong, DT, Lim, J, Goh, X, Pratap, J, Pereira, BP, Kwok, HS, Nathan, SS, Dobson, JR, Lian, JB, Ito, Y, Voorhoeve, PM, Stein, GS, Salto-Tellez, M, Cool, SM, Van Wijnen, AJ. 2010. Cancer-related ectopic expression of the bone-related transcription factor RUNX2 in non-osseous metastatic tumor cells is linked to cell proliferation and motility. *Breast cancer research : BCR* 12: R89.
- Li, H, Durbin, R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)* 25: 1754–60.
- Li, H, Tejero, R, Monleon, D, Bassolino-Klimas, D, Abate-Shen, C, Brucoleri, RE, Montelione, GT. 1997. Homology modeling using simulated annealing of restrained molecular dynamics and conformational search calculations with CONGEN: application in predicting the three-dimensional structure of murine homeodomain Msx-1. *Protein science : a publication of the Protein Society* 6: 956–70.
- Li, Q, Brown, JB, Huang, H, Bickel, PJ. 2011. Measuring reproducibility of high-throughput experiments. *The Annals of Applied Statistics* 5: 1752–1779.
- Liu, YH, Kundu, R, Wu, L, Luo, W, Ignelzi, M a, Snead, ML, Maxson, RE. 1995. Premature suture closure and ectopic cranial bone in mice expressing Msx2 transgenes in the developing skull. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 6137–41.
- Logan, M, Martin, JF, Nagy, A, Lobe, C, Olson, EN, Tabin, CJ. 2002. Expression of Cre Recombinase in the developing mouse limb bud driven by a Prx1 enhancer. *Genesis (New York, N.Y. : 2000)* 33: 77–80.

- Logan, M, Tabin, C. 1998. Targeted gene misexpression in chick limb buds using avian replication-competent retroviruses. *Methods (San Diego, Calif.)* 14: 407–20.
- Long, F. 2012. Building strong bones: molecular regulation of the osteoblast lineage. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13: 27–38.
- Luciakova, K, Kollarovic, G, Kretova, M, Sabova, L, Nelson, BD. 2011. TGF- β signals the formation of a unique NF1/Smad4-dependent transcription repressor-complex in human diploid fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications* 411: 648–53.
- Ma, L, Golden, S, Wu, L, Maxson, R. 1996. The molecular basis of Boston-type craniosynostosis: the Pro148-->His mutation in the N-terminal arm of the MSX2 homeodomain stabilizes DNA binding without altering nucleotide sequence preferences. *Human molecular genetics* 5: 1915–20.
- Maeno, T, Moriishi, T, Yoshida, CA, Komori, H, Kanatani, N, Izumi, S, Takaoka, K, Komori, T. 2011. Early onset of Runx2 expression caused craniosynostosis, ectopic bone formation, and limb defects. *Bone* 49: 673–82.
- Maes, C, Kobayashi, T, Selig, MK, Torrekens, S, Roth, SI, Mackem, S, Carmeliet, G, Kronenberg, HM. 2010. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental cell* 19: 329–44.
- Mavrogiannis, L a, Taylor, IB, Davies, SJ, Ramos, FJ, Olivares, JL, Wilkie, AOM. 2006. Enlarged parietal foramina caused by mutations in the homeobox genes ALX4 and MSX2: from genotype to phenotype. *European journal of human genetics : EJHG* 14: 151–8.
- McLarren, KW, Theriault, FM, Stifani, S. 2001. Association with the nuclear matrix and interaction with Groucho and RUNX proteins regulate the transcription repression activity of the basic helix loop helix factor Hes1. *The Journal of biological chemistry* 276: 1578–84.
- Müller, H. 2001. PCR - Polymerase-Kettenreaktion. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Mundlos, S, Otto, F, Mundlos, C, Mulliken, JB, Aylsworth, a S, Albright, S, Lindhout, D, Cole, WG, Henn, W, Knoll, JH, Owen, MJ, Mertelsmann, R, Zabel, BU, Olsen, BR. 1997. Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89: 773–9.
- Nakashima, K, Zhou, X, Kunkel, G, Zhang, Z, Deng, JM, Behringer, RR, De Crombrughe, B. 2002. Cell - The Novel Zinc Finger-Containing Transcription Factor Osterix Is Required for Osteoblast Differentiation and Bone Formation. *Cell* 108: 17–29.
- Newberry, EP, Latifi, T, Battaile, JT, Towler, D a. 1997. Structure-function analysis of Msx2-mediated transcriptional suppression. *Biochemistry* 36: 10451–62.
- Nieman, M, Prudoff, R. 1999. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of cell ...* 147: 631–643.
- Niu, D-F, Kondo, T, Nakazawa, T, Oishi, N, Kawasaki, T, Mochizuki, K, Yamane, T, Katoh, R. 2012. Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial-mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92: 1181–90.
- Oldershaw, R a, Tew, SR, Russell, AM, Meade, K, Hawkins, R, McKay, TR, Brennan, KR, Hardingham, TE. 2008. Notch signaling through Jagged-1 is necessary to initiate chondrogenesis in human bone marrow stromal cells but must be switched off to complete chondrogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26: 666–74.

- Ong, C-T, Cheng, H-T, Chang, L-W, Ohtsuka, T, Kageyama, R, Stormo, GD, Kopan, R. 2006. Target selectivity of vertebrate notch proteins. Collaboration between discrete domains and CSL-binding site architecture determines activation probability. *The Journal of biological chemistry* 281: 5106–19.
- Ott, CE, Hein, H, Lohan, S, Hoogeboom, J, Foulds, N, Grünhagen, J, Stricker, S, Villavicencio-Lorini, P, Klopocki, E, Mundlos, S. 2012. Microduplications upstream of MSX2 are associated with a phenocopy of cleidocranial dysplasia. *Journal of medical genetics* 49: 437–41.
- Otto, F, Thornell, a P, Crompton, T, Denzel, a, Gilmour, KC, Rosewell, IR, Stamp, GW, Beddington, RS, Mundlos, S, Olsen, BR, Selby, PB, Owen, MJ. 1997. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89: 765–71.
- Owen, T a, Aronow, M, Shalhoub, V, Barone, LM, Wilming, L, Tassinari, MS, Kennedy, MB, Pockwinse, S, Lian, JB, Stein, GS. 1990. Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of cellular physiology* 143: 420–30.
- Pan, Y, Liu, Z, Shen, J, Kopan, R. 2005. Notch1 and 2 cooperate in limb ectoderm to receive an early Jagged2 signal regulating interdigital apoptosis. *Developmental biology* 286: 472–82.
- Park, S-M, Gaur, AB, Lengyel, E, Peter, ME. 2008. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & development* 22: 894–907.
- Pratap, J, Wixted, JJ, Gaur, T, Zaidi, SK, Dobson, J, Gokul, KD, Hussain, S, Van Wijnen, AJ, Stein, JL, Stein, GS, Lian, JB. 2008. Runx2 transcriptional activation of Indian Hedgehog and a downstream bone metastatic pathway in breast cancer cells. *Cancer research* 68: 7795–802.
- Qian, YQ, Billeter, M, Otting, G, Müller, M, Gehring, WJ, Wüthrich, K. 1989. The structure of the Antennapedia homeodomain determined by NMR spectroscopy in solution: comparison with prokaryotic repressors. *Cell* 59: 573–80.
- Richardson, J, Richardson, D. 1988. Amino acid preferences for specific locations at the ends of α -helices. *Science* 240.
- Sambrook, Russel. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Tilló, E, Liu, Y, De Barrios, O, Siles, L, Fanlo, L, Cuatrecasas, M, Darling, DS, Dean, DC, Castells, A, Postigo, A. 2012. EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69: 3429–56.
- Satokata, I, Ma, L, Ohshima, H, Bei, M, Woo, I, Nishizawa, K, Maeda, T, Takano, Y, Uchiyama, M, Heaney, S, Peters, H, Tang, Z, Maxson, R, Maas, R. 2000. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nature genetics* 24: 391–5.
- Satokata, I, Maas, R. 1994. Msx1 deficient mice exhibited cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nature Genetics* 6: 348–355.
- Schmidt, D, Wilson, MD, Ballester, B, Schwalie, PC, Brown, GD, Marshall, A, Kutter, C, Watt, S, Martinez-Jimenez, CP, Mackay, S, Talianidis, I, Flicek, P, Odom, DT. 2010. Five-vertebrate ChIP-seq reveals the evolutionary dynamics of transcription factor binding. *Science (New York, N.Y.)* 328: 1036–40.

- Schroeder, TM, Jensen, ED, Westendorf, JJ. 2005. Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews* 75: 213–25.
- Seemann, P, Brehm, A, König, J, Reissner, C, Stricker, S, Kuss, P, Haupt, J, Renninger, S, Nickel, J, Sebald, W, Groppe, JC, Plöger, F, Pohl, J, Schmidt-von Kegler, M, Walther, M, Gassner, I, Rusu, C, Janecke, AR, Dathe, K, Mundlos, S. 2009. Mutations in GDF5 reveal a key residue mediating BMP inhibition by NOGGIN. *PLoS genetics* 5: e1000747.
- Semenza, G, Wang, G, Kundu, R. 1995. DNA binding and transcriptional properties of wild-type and mutant forms of the homeodomain protein Msx2. *Biochemical and biophysical research*
- Shang, Z, Isaac, VE, Li, H, Patel, L, Catron, KM, Curran, T, Montelione, GT, Abate, C. 1994. Design of a “minimAl” homeodomain: the N-terminal arm modulates DNA binding affinity and stabilizes homeodomain structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 8373–7.
- Shirakabe, K, Terasawa, K, Miyama, K, Shibuya, H, Nishida, E. 2001. Regulation of the activity of the transcription factor Runx2 by two homeobox proteins, Msx2 and Dlx5. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 6: 851–6.
- Simpson, M a, Irving, MD, Asilmaz, E, Gray, MJ, Dafou, D, Elmslie, F V, Mansour, S, Holder, SE, Brain, CE, Burton, BK, Kim, KH, Pauli, RM, Aftimos, S, Stewart, H, Kim, CA, Holder-Espinasse, M, Robertson, SP, Drake, WM, Trembath, RC. 2011. Mutations in NOTCH2 cause Hajdu-Cheney syndrome, a disorder of severe and progressive bone loss. *Nature genetics* 43: 303–5.
- Spivakov, M, Akhtar, J, Kheradpour, P, Beal, K, Girardot, C, Koscielny, G, Herrero, J, Kellis, M, Furlong, EEM, Birney, E. 2012. Analysis of variation at transcription factor binding sites in *Drosophila* and humans. *Genome biology* 13: R49.
- Stasinopoulos, I a, Mironchik, Y, Raman, A, Wildes, F, Winnard, P, Raman, V. 2005. HOXA5-twist interaction alters p53 homeostasis in breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* 280: 2294–9.
- Stricker, S. 2002. Molekulargenetische Analyse der Knorpeldifferenzierung im Skelett von Wirbeltieren. Dissertation.
- Takahashi, H, Kamiya, A, Ishiguro, A, Suzuki, AC, Saitou, N, Toyoda, A, Aruga, J. 2008. Conservation and diversification of Msx protein in metazoan evolution. *Molecular biology and evolution* 25: 69–82.
- Takeda, S, Bonnamy, JP, Owen, MJ, Ducy, P, Karsenty, G. 2001. Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice. *Genes & development* 15: 467–81.
- Tang, L. 1999. Crystal Structure of the Nuclear Matrix Targeting Signal of the Transcription Factor Acute Myelogenous Leukemia-1/Polyoma Enhancer-binding Protein 2alpha B/Core Binding Factor alpha 2. *Journal of Biological Chemistry* 274: 33580–33586.
- Thomas-Chollier, M, Sand, O, Turatsinze, J-V, Janky, R, Defrance, M, Vervisch, E, Brohée, S, Van Helden, J. 2008. RSAT: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic acids research* 36: W119–27.

- Ueta, C, Iwamoto, M, Kanatani, N, Yoshida, C, Liu, Y, Enomoto-Iwamoto, M, Ohmori, T, Enomoto, H, Nakata, K, Takada, K, Kurisu, K, Komori, T. 2001. Skeletal malformations caused by overexpression of *Cbfa1* or its dominant negative form in chondrocytes. *The Journal of cell biology* 153: 87–100.
- Vega, RB, Matsuda, K, Oh, J, Barbosa, AC, Yang, X, Meadows, E, McAnally, J, Pomajzl, C, Shelton, JM, Richardson, J a, Karsenty, G, Olson, EN. 2004. Histone deacetylase 4 controls chondrocyte hypertrophy during skeletogenesis. *Cell* 119: 555–66.
- Villavicencio-Lorini, P, Kuss, P. 2010. Homeobox genes *d11–d13* and *a13* control mouse autopod cortical bone and joint formation. *The Journal of Clinical Investigation* 120: 1994–2004.
- Whitfield, TW, Wang, J, Collins, PJ, Partridge, EC, Aldred, SF, Trinklein, ND, Myers, RM, Weng, Z. 2012. Functional analysis of transcription factor binding sites in human promoters. *Genome biology* 13: R50.
- Wilkie, a O, Tang, Z, Elanko, N, Walsh, S, Twigg, SR, Hurst, J a, Wall, S a, Chrzanowska, KH, Maxson, RE. 2000. Functional haploinsufficiency of the human homeobox gene *MSX2* causes defects in skull ossification. *Nature genetics* 24: 387–90.
- Winograd, J, Reilly, MP, Roe, R, Lutz, J, Laughner, E, Xu, X, Hu, L, Asakura, T, Vander Kolk, C, Strandberg, JD, Semenza, GL. 1997. Perinatal lethality and multiple craniofacial malformations in *MSX2* transgenic mice. *Human molecular genetics* 6: 369–79.
- Witte, F, Dokas, J, Neuendorf, F, Mundlos, S, Stricker, S. 2009. Comprehensive expression analysis of all *Wnt* genes and their major secreted antagonists during mouse limb development and cartilage differentiation. *Gene expression patterns : GEP* 9: 215–23.
- Wolberger, C. 1996. Homeodomain interactions. *Current opinion in structural biology* 6: 62–8.
- Wuyts, W, Reardon, W, Preis, S, Homfray, T, Rasore-Quartino, a, Christians, H, Willems, PJ, Van Hul, W. 2000. Identification of mutations in the *MSX2* homeobox gene in families affected with foramina parietalia permagna. *Human molecular genetics* 9: 1251–5.
- Yamaguchi, TP, Bradley, a, McMahon, a P, Jones, S. 1999. A *Wnt5a* pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development (Cambridge, England)* 126: 1211–23.
- Yang, Y. 2003. *Wnt5a* and *Wnt5b* exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development* 130: 1003–1015.
- Yen, H-Y, Ting, M-C, Maxson, RE. 2010. *Jagged1* functions downstream of *Twist1* in the specification of the coronal suture and the formation of a boundary between osteogenic and non-osteogenic cells. *Developmental biology* 347: 258–70.
- Yip, KY, Cheng, C, Bhardwaj, N, Brown, JB, Leng, J, Kundaje, A, Rozowsky, J, Birney, E, Bickel, P, Snyder, M, Gerstein, M. 2012. Classification of human genomic regions based on experimentally determined binding sites of more than 100 transcription-related factors. *Genome biology* 13: R48.
- Yoshida, C a, Yamamoto, H, Fujita, T, Furuichi, T, Ito, K, Inoue, K, Yamana, K, Zanma, A, Takada, K, Ito, Y, Komori, T. 2004. *Runx2* and *Runx3* are essential for chondrocyte maturation, and *Runx2* regulates limb growth through induction of Indian hedgehog. *Genes & development* 18: 952–63.

- Zaidi, SK, Javed, A, Choi, J-YY, Van Wijnen, AJ, Stein, JL, Lian, JB, Stein, GS. 2001. A specific targeting signal directs Runx2/Cbfa1 to subnuclear domains and contributes to transactivation of the osteocalcin gene. *J. Cell Sci.* 114: 3093–3102.
- Zaidi, SK, Young, DW, Choi, J-Y, Pratap, J, Javed, A, Montecino, M, Stein, JL, Lian, JB, Van Wijnen, AJ, Stein, GS. 2004. Intranuclear trafficking: organization and assembly of regulatory machinery for combinatorial biological control. *The Journal of biological chemistry* 279: 43363–6.
- Zeng, C. 1997. Identification of a nuclear matrix targeting signal in the leukemia and bone-related AML/CBF-alpha transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 6746–6751.
- Zhang, H, Catron, KM, Abate-Shen, C. 1996. A role for the Msx-1 homeodomain in transcriptional regulation: residues in the N-terminal arm mediate TATA binding protein interaction and transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93: 1764–9.
- Zhang, H, Hu, G, Wang, H. 1997. Heterodimerization of Msx and Dlx homeoproteins results in functional antagonism. ... and cellular biology.
- Zhang, Y, Liu, T, Meyer, C a, Eeckhoute, J, Johnson, DS, Bernstein, BE, Nusbaum, C, Myers, RM, Brown, M, Li, W, Liu, XS. 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 9: R137.

9 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius	l	Liter
μ	Mikro- (als Präfix)	LB	Luria-Bertani
∞	unendlich	min	Minute
ALP	Alkaline Phosphatase	n	Nano- (als Präfix)
ATP	Adenosintriphosphat	NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-indolyl-Phosphat	NGS	<i>next generation sequencing</i>
bp	Basenpaare	OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
BSA	Rinder Serum Albumin	PBS	Phosphat-gepufferte Saline
CCD	Cleidocraniale Dysplasie	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	PFA	Paraformaldehyd
CDS	kodierende Sequenz	PFM	Parietalia foramina
CentriMo	Central Motif Enrichment Analysis	<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation	<i>Phu</i>	<i>Phusion</i>
chMM	Hühner-Micromasskultur	qPCR	quantitative PCR
CMV	<i>Cytomegalovirus</i>	rel.	relativ
DEPC	Diethylpyrocarbonat	RNA	Ribonukleinsäure
DIG	Digoxygenin	RNAi	RNA Interferenz
DMEM	Dulbeccos's modified eagle's medium	rpm	Umdrehungen pro Minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	RSAT	Regulatory Sequence Analysis Tool
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RT	Raumtemperatur
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	SDS	Natriumdodecylsulfat
DREME	Discriminative DNA Motif Discovery	sec	Sekunde
E	Embryonalstadium (Maus)	siRNA	short interfering RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	SSC	Saline Natrium-Zitrat
EtBr	Ethidiumbromid	TAE	Tris-Acetat-EDTA
FCS	Fötale Rinderserum	<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
g	Gramm oder Erdbeschleunigung	TOMTOM	Motif Comparison Tool
GFP	Grün fluoreszierendes Protein	UCSC	University of California, Santa Cruz
GO	Genontologie	UTR	untranslatierter Bereich
h	Stunde	UV	Ultraviolett
HRP	Meerrettich Peroxidase	V	Volt
IDR	<i>irreproducible discovery rate</i>	w/v	Gewicht / Totalvolumen
ISH	In situ Hybridisierung	WB	Wester Blot
kb	Kilobasen	WT	Wildtyp
kDa	Kilodalton		
KO	Knockout		

10 Anhang

Kongressbeiträge

Poster-Präsentation:

Refining the Gene Regulatory Network of Osteoblast Differentiation in Vertebrate Skeletogenesis.

EVONET conference “Evolution of Gene Regulatory Networks in Animal Development”.

Wien 2013

Publikationen

Ott, CE, Hein, H, Lohan, S, Hoogeboom, J, Foulds, N, Grünhagen, J, Stricker, S, Villavicencio-Lorini, P, Klopocki, E, Mundlos, S. 2012. **Microduplications upstream of MSX2 are associated with a phenocopy of cleidocranial dysplasia.** Journal of medical genetics 49: 437–41.